



**MONOKLONÁLIS ANTITEST-TERMELŐ CHO SEJTVONALAK
PRODUKTIVITÁSÁNAK KONTROLLÁLÁSA KÜLÖNBÖZŐ
RÁTÁPLÁLÁSI STRATÉGIÁK SEGÍTSÉGÉVEL**

TDK dolgozat

Készítette: **Molnár Dóra**
Biomérnök, MSc II. évf.

Témavezető: **Zalai Dénes**
Kutató-fejlesztő, Richter Gedeon Nyrt.

Konzulens: **Dr. Gergely Szilveszter**
Egyetemi docens, BME-ABÉT

Richter Gedeon Nyrt.
Biotechnológiai Osztály

2014

Tartalomjegyzék

1.	BEVEZETÉS	4
2.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS	5
2.1.	REKOMBINÁNS FEHÉRJETERMÉKEK A GYÓGYSZERGYÁRTÁSBAN	5
2.2.	A SEJT TENYÉSZTÉSI TECHNOLÓGIÁK FEJLŐDÉSE	6
2.3.	EMLŐSEJTEK METABOLIZMUSÁNAK JELLEMZŐI	7
2.4.	KONTROLL STRATÉGIÁK A PRODUKTIVITÁS BEFOLYÁSOLÁSÁRA	9
2.4.1.	A feed-összetétel jelentősége	11
3.	CÉLKITŰZÉS	14
4.	ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	15
4.1.	FED-BATCH KÍSÉRLETEK VÁZLATA	15
4.2.	INOKULUM ELŐKÉSZÍTÉS	16
4.3.	KÍSÉRLETEK 1L-ES REAKTOROKBAN	17
4.4.	MÉRT PARAMÉTEREK	19
4.4.1.	On-line mért paraméterek	19
4.4.2.	At-line és off-line mért paraméterek	19
4.5.	SPECIFIKUS ÉRTÉKEK MEGHATÁROZÁSA	20
5.	EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE	22
5.1.	KÍSÉRLETEK FELÉPÍTÉSE	22
5.2.	SEJTEK FIZIOLÓGIAI JELLEMZŐINEK ÖSSZEHOSONLÍTÁSA	22
5.3.	FEED-STRATÉGIÁK ÖSSZEHOSONLÍTÁSA	27
5.4.	SEJTEK SPECIFIKUS PRODUKTIVITÁSÁNAK ÖSSZEHOSONLÍTÁSA	29
6.	ÖSSZEFOGLALÁS	38
7.	IRODALOMJEGYZÉK	39

A FELHASZNÁLT RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

RÖVIDÍTÉS	ANGOL MEGFELELŐ	MAGYAR JELENTÉS
μ	Specific Growth Rate	Specifikus növekedési sebesség
BHK	Baby Hamster Kidney	Újszülött hörcsög vese (sejt)
CHO	Chinese Hamster Ovary	Kínai hörcsög petefészeksejt
DCU	Digital Control Unit	Digitális szabályzó egység
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FDA	US Food and Drug Administration	Amerikai Élelmiszer- és Gyógyszer-engedélyeztetési Hivatal
HeLa ¹	HeLa	HeLa sejtvonala
mAb	Monoclonal Antibody	Monoklonális antitest
MFC	Mass Flow Controller	Tömegáram szabályzó
OUR	Oxygen Uptake Rate	Oxigén-felvételi sebesség
<i>qp</i>	Cell-specific productivity	Sejt-specifikus produktivitás
VCD	Viable Cell Density	Élő sejt denzitás
<i>T</i>	Temperature	Hőmérséklet
TCA	Tricarboxylic Acid (Cycle)	Citromsav(-ciklus)
<i>Y</i>	Yield	Hozam

¹Nevét Henrietta Lacks-ról kapta, aki méhnyakrákban hunyt el 1951-ben. Halála után orvosai tumorsejt-mintát vettek tőle, melyet Petri-csészében tudtak tenyészteni.

1. BEVEZETÉS

Az elmúlt két évtizedben a terápiás glikoproteinek iránti kereslet – és ezzel együtt a megfelelő minőségű és mennyiségű fehérjetermék előállítására irányuló folyamat-fejlesztések iránti igény – nagymértékben megnőtt. Kezdetben ezeket a termékeket emberi szövetekből vagy vérből vonták ki, azonban ezeknél a módszereknél nagy hátrányt jelentett, hogy tartalmazhattak olyan fertőzéseket, melyeket csak bonyolult technológiával lehetett eltávolítani. Ezzel szemben a rekombináns fehérjetermékek genetikailag módosított sejtekkel történő előállítása sokkal biztonságosabb.

A rekombináns fehérjetermékeket általában emlős, illetve rovar sejtek, baktériumok és élesztők segítségével állítják elő. Ezen expressziós rendszerek közül az emlős sejtes technológiákat alkalmazzák elsősorban az összetett glikozilációs mintázattal rendelkező fehérjék előállítására, ugyanis ezen expressziós rendszerek segítségével lehetőség nyílik az emberi szervezetben megtalálható fehérjékhez hasonló szerkezetű és biokémiai tulajdonságokkal rendelkező molekulák előállítására. Az iparban több egér-, illetve hörcsög-eredetű sejtvonal is rendelkezésre áll, azonban az összes rekombináns fehérjetermék mintegy 70%-át kínai hörcsög petesejtekkel (CHO) termeltetik. Az évtizedek óta folytatott kutatások és klinikai vizsgálatok alatt felhalmozott tudásnak köszönhetően a CHO sejtek ma már nagy biztonsággal alkalmazhatók a rekombináns fehérjék előállítására. Ezen sejtek könnyen adaptálhatók kémiaiilag definiált tápoldatokhoz, rövid generációs idővel tenyésztethetők szuszpenziós tenyészetben, továbbá genetikailag könnyen módosíthatók.

A CHO sejtek által termelt fehérjék terápiás célú felhasználhatósága tehát jól ismert, azonban a gyártásukra vonatkozó folyamatos technológia-fejlesztés gazdasági szempontból kívánatos. A tenyésztési körülmények optimalizálásával és a megfelelő rátáplálási (feed) stratégia kidolgozásával szabályozhatóvá válhat a tenyészet produktivitása, ami egy fontos technológiai faktor a rekombináns fehérjegyártás területén.

Munkánk során egy CHO sejtvonal két klónját – egy, a korábbi kísérletekben alkalmazott klónt, és ugyanazon sejt genetikailag módosított változatát – vizsgáltuk fed-batch tenyészetekben. Célkitűzésünk a két klón sejtfiziológiájának és produktivitásának az összehasonlítása volt, továbbá megvizsgáltuk két különböző feed-stratégia (bolusz vs. folytonos) hatását a tenyészetekre. Célunk volt továbbá a sejtek specifikus produktivitásának befolyásolása különböző tápanyag-limitációk kiváltásával.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. REKOMBINÁNS FEHÉRJETERMÉKEK A GYÓGYSZERGYÁRTÁSBAN

A rekombináns fehérjetermékek hatékony terápiát jelentenek számos korábban kezelhetetlen betegségre, ezért az utóbbi évtizedekben egyre nagyobb jelentőséggel bírnak a modern orvoslásban (Jayapal, 2007). Számos ráegcsáló, és humán eredetű sejtvonalat alkalmaznak a különböző, heterológ fehérjeexpressziós kutatások során (pl.: CHO, BHK, HeLa), mégis a CHO sejtek a legszélesebb körben alkalmazott élő rendszerek a rekombináns glikoproteinek előállításában (Kyriakopoulos & Kontoravdi, 2012). Népszerűségüket többek között kiváló adaptációs képességüknek és könnyű genetikai manipulálhatóságuknak köszönhetik. A CHO sejtek könnyen adaptálódnak szérumentes szuszpenzióban, és jól tenyésztethetők bioreaktorban emellett képesek a fehérjékre olyan glikán formákat szintetizálni, melyek hasonlóak az emberi sejtek által szintetizált formákhoz (Jayapal, 2007; Kim *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2005). Továbbá kimutatták, hogy a legtöbb humán vírus (pl.: HIV, rubeola) nem képes a CHO sejtekben replikálódni (Wiebe, 1989), ez a technológiák biztonságossága miatt fontos (vírusmentes termékek gyártása).

Az elmúlt két évtizedben bizonyítást nyert a CHO sejtvonalak biztonságos alkalmazása a rekombináns fehérjetermékek előállítására, ezáltal egyszerűbbé vált a terápiás fehérjék engedélyezési folyamata a különböző egészségügyi hatóságoknál (pl.: FDA) (Kim *et al.*, 2012). Habár több emlős sejtvonal is rendelkezésre áll, az összes rekombináns fehérjetermék mintegy 70%-át CHO sejtekkel termeltetik (Jayapal, 2007), jelenleg a tíz legkeresettebb biológiai gyógyszerből hetet CHO sejtekkel gyártanak (1. táblázat) (Huggett & Lahteenmarki, 2012).

1. táblázat: A 10 legkeresettebb biológiai gyógyszer 2011-ben (Huggett & Lahteenmarki, 2012)

Name	Production cell lines	2011 worldwide sales (dollars in billions)
Humira (adalimumab)	CHO	7.932
Enbrel (etanercept)	CHO	7.367
Rituxan (rituxan)	CHO	6.772
Remicade (infliximab)	Mouse myeloma (NS0)	6.751
Avastin (bevacizumab)	CHO	5.968
Herceptin (trastuzumab)	CHO	5.924
Neulasta (pegfilgrastim)	<i>E. coli</i>	3.952
Lucentis (ranibizumab)	<i>E. coli</i>	3.769
Avonex (interferon beta-1a)	CHO	2.687
Rebif (interferon beta-1a)	CHO	2.354

2.2. A SEJT TENYÉSZTÉSI TECHNOLÓGIÁK FEJLŐDÉSE

Kezdetben a CHO sejtek használatának egyik hátránya az alacsony specifikus produktivitás volt, ez azonban ma már növelhető génamplifikációval (Kim *et al.*, 2012). A '90-es évek elején a sejttenyészetekben ~500 mg/l termék koncentráció volt a jellemző, napjainkban már 1 g/l feletti termék koncentráció rutinszerűen elérhető az iparban, de az irodalom számos esetről számol be, ahol CHO tenyészetekben akár 5 g/l titert is elértek (Birch & Racher, 2006; Shukla & Thömmes, 2010; Wurm, 2004).

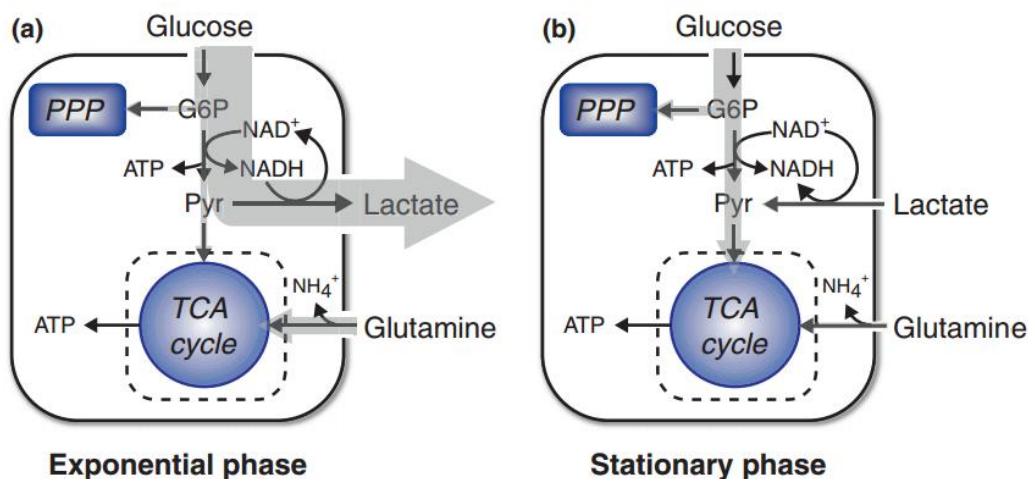
A nagy termelékenységű, robosztus monoklonális antitest (mAb) gyártási technológiák gyors fejlődése központi szerepet tölt be a biológiai gyógyszergyártás területén (Shukla & Thömmes, 2010; Wurm, 2004). A humán-genom projekt befejeztével egyre több terápiás célú fehérjeterméket fedeztek fel, melyeknek nagy része glikoprotein. Ezen glikoproteinek oligoszacharid-szerkezete meghatározó a gyógyszeripari felhasználás szempontjából. A fehérjéhez kapcsolódó glikánok heterogenitása nagymértékben függ a tenyésztési körülményektől: a tápanyagoktól, a metabolitok felhalmozódásától, a sejtek életképességétől (viabilitásától), a *pH*-tól és a hőmérséklettől (Wong *et al.*, 2005). Ahhoz, hogy egy komplex képet kapjunk a tenyészetekben lezajló folyamatokról, a sejtnövekedésről és a produktivitásról, valamint a köztük lévő kapcsolatokról, fel kell tárni az összefüggéseket, és a folyamat paramétereinek hatását az egyes kinetikai változókra (Sheikholeslami *et al.*, 2014).

A rekombináns fehérjegyártás során az egyik legfőbb cél a módszerek olyan irányú fejlesztése, mely minél magasabb titert eredményez a hagyományos fed-batch tenyészetekben. Az expressziós vektorok optimalizálásával, a sejtvonal és a médium megfelelő megválasztásával, illetve a tenyésztési paraméterek optimalizálásával elérhető a specifikus produktivitás, illetve a sejtszám növelése. A specifikus produktivitás azonban ugyanazon sejtvonalnál is jelentősen eltérhet különböző tenyésztési körülmények között. Azon stratégiák azonosítása, melynek segítségével maximalizálható a specifikus produktivitás a teljes fed-batch tenyésztés alatt, döntő fontosságú a fejlesztések során a rekombináns fehérjegyártás területén (Yu *et al.*, 2011).

2.3. EMLŐSSEJTEK METABOLIZMUSÁNAK JELLEMZŐI

A folytonos sejtvonalak szén, nitrogén és energia (ATP), valamint redukáló ágens (NADPH) folyamatos jelenlétét igénylik annak érdekében, hogy el tudják látni anabolikus funkcióikat. A legtöbb ilyen sejtvonal – köztük az iparban is alkalmazottak – metabolikus viselkedése nagymértékben függ az aerob glikolízistől, mely biztosítja ezen sejteknek a növekedéséhez szükséges energiát (1. ~~ábra1-ábra~~). Habár a glikolízis egy felvett glükóz molekula után csupán 2 mol ATP-t szolgáltat a sejteknek, a mitokondriális oxidatív foszforiláció során ugyanennyi glükóz után 36 mol ATP keletkezik. Ennek eredményeképpen az aerob glikolízis bioenergetikai és bioszintetikus oldalról „pazarló” folyamatnak tekinthető (Young, 2013).

A TCA ciklus során a glutamint a sejtek képesek ugyan lebontani, de ez szintén „pazarlás”, hiszen az általa biztosított nitrogén megemelkedett ammónia és alanin termelést eredményez. Ezek a megfigyelések azt mutatják, hogy ezen sejtvonalak nem a gazdaságos szén-, nitrogén-, és energiaforrás-felhasználásra vannak programozva, hanem arra, hogy növeljék a tápanyagfelvételt azon túl is, amire szükségük van. Ez a termelt metabolitok akkumulációját eredményezi, melynek hatására csökken a sejtek viabilitása és a termelt rekombináns fehérje mennyisége, valamint megnő a sejtenyésztési technológia variabilitása (Young, 2013).



1. ábra: Folytonos sejtvonalak fenotípusai exponenciális és stacioner fázisban (Young, 2013)

Az 1. ~~ábra1-ábra~~ jól szemlélteti, hogy a sejtek metabolizmusa változik az exponenciális és stacioner fázisok alatt. A sejtenyésztetekben az exponenciális fázisra a sejtszám növekedése, míg a stacioner fázisban a rekombináns fehérje-termelés a jellemző. Az exponenciális fázisban a szaporodó sejtek a glutamint a mitokondriális anyagcsere „üzemanyagként” használják fel, ez fokozott ammónia és laktát termeléshez vezet. A stacioner fázisba lépve lecsökken a sejtek specifikus glükóz és glutamin felvételi sebessége, a felvett glükózt főként a

TCA ciklusban történő oxidáció útján bontják, ami megnövekedett ATP hozamot, és alacsonyabb melléktermék-akkumulációt eredményez. A felvett glükóz egy része az oxidatív pentóz-foszfát útvonalban járul hozzá a megfelelő NADPH szint fenntartásához (Young, 2013).

A rekombináns fehérjék termelése energiaigényes folyamat, ~3 ATP molekulára van szüksége a sejtnak egyetlen peptid-kötés szintetizálásához. Egy nagy-termelékenyséű sejt vonal képes akár naponta 40 pg mAb-ot előállítani, ami a sejt összes intracelluláris fehérjéinek a 20%-át teszi ki. Nagy kihívást jelent a fed-batch fermentációknál, hogy a sejtek metabolizmusa jelentősen változhat a folyamat során. Ezt a változást az 1. ábrán bemutatott különbségeken túl a tápanyagok hozzáférhetőségének változása, továbbá a sejt denzitás változása befolyásolhatja az egyes növekedési fázisok között (Templeton *et al.*, 2013).

Az emlőssejtek gyors glikolízisének melléktermékeként laktát képződik (még oxigén jelenlétében is), a jelenlévő glutamint pedig ammóniává alakítják át. A toxikus melléktermékek (laktát, ammónia) képesek akkumulálódni a korai növekedési fázisban, így gátolják a sejt-növekedést és a produktivitást, a későbbi fázisban pedig hatással vannak a fehérje-glikozilációra, továbbá a melléktermék felhalmozódás túlzott növekedést okozhat az ozmolalításban, ami bizonyos érték felett toxikus lehet a sejtek számára (Templeton *et al.*, 2013). Hansen és Emborg CHO tenyészetekben vizsgálták az ammónia koncentráció hatását a sejtnövekedésre, kísérleteik során a feed ammónia koncentrációját fokozatosan növelték. 5 mM koncentrációig az élő sejt denzitás nőtt, 5-7,5 mM között állandó volt – ekkor a reaktorban mért ammónia koncentráció már 8 mM volt. Azt feltételezték, hogy a sejtek hozzászoktak a fokozatosan növekvő ammónia-koncentrációhoz (Hansen & Emborg, 1994). Takagi és mtsai. azt tapasztalták, hogy 4 mM ammónia koncentráció nincs hatással a specifikus növekedési sebességre (μ), 6 mM-nál azonban megáll a sejtnövekedés. A növekvő ammónia koncentráció mellett a specifikus glutamin felvételi sebesség (q_{Gln}) és így az ammónia termelés további növekedését tapasztalták, amiből arra következtettek, hogy az ammónia bizonyos koncentráció (4 mM) felett saját termelődését indukálja (Takagi *et al.*, 2001).

Az említett toxikus melléktermékek akkumulációjának minimalizálása a biotechnológiai ipar egyik fontos célja már 25 éve, azonban ez a kérdés mindmáig megoldatlan. Számos sejt kultúrában sikerült a tenyészetekben az egyensúlyt a termeléstől a fogyasztás irányába eltolni, azonban a mechanizmus, ami képes kontrollálni ezt a folyamatot kevésbé ismert

(Templeton *et al.*, 2013). Azt azonban kimutatták, hogy azok a sejtek, melyek képesek a laktát termelésből fogyasztásba átváltani, magasabb titert képesek elérni, ezért még nagyobb jelentőségűvé válhat a laktát-metabolizmus szabályozása (Schaub *et al.*, 2012).

A tenyészetekben a szubsztrátok és metabolitok koncentrációjának mérése mellett fontos az oxigén-felvétel folyamatos monitorozása, amely nem csak a sejtnövekedésről, hanem a tenyészetben lezajló metabolikus folyamatokról is információt nyújt. A sejtek oxigén-felvételi sebessége (*OUR*) továbbá nagymértékben korrelál a specifikus produktivitással, mely jelzi az oxidatív foszforiláció pozitív hatását a produktivitásra (Link *et al.*, 2003).

Az *OUR* tehát fontos paraméter a sejt-metabolizmus monitorozása során, értéke függ a sejt denzitástól, és relatíve konstans szintű az exponenciális-növekedési fázis alatt, így azt a pontot, ahol elkezdi csökkenni, jó közelítéssel tekinthetjük a fázis végének. Az *OUR* folyamatos monitorozása tehát alkalmas eszközként szolgálhat a feed-összetétel és stratégia optimalizálásában is (Huang *et al.*, 2010).

Számos tanulmány foglalkozik a sejtek metabolizmusának pontos megismerésével – különös tekintettel a növekedési fázisok közötti különbségek feltárásával –, ami nagy jelentőséggel bír az ipari fed-batch folyamatok optimalizálásában (Templeton *et al.*, 2013). A metabolizmus vizsgálata és megértése segíthet a produktivitást befolyásoló folyamatok és paraméterek megértésében és azonosításában.

2.4. KONTROLL STRATÉGIÁK A PRODUKTIVITÁS BEFOLYÁSOLÁSÁRA

Jelenleg a könnyű kezelhetőségüknek és megbízhatóságuknak köszönhetően a batch és fed-batch tenyésztési módszerek a leginkább elterjedtek az iparban. A fed-batch kultúrák esetében időközönkénti tápoldat adagolással elérhető a tenyészet növekedésének és produktivitásának meghosszabbítása (Wong *et al.*, 2005). A fed-batch tenyészetekben a két legfőbb tényező, mely befolyásolja a termelt fehérje koncentrációját, az élő sejt denzitás (*VCD*) és a specifikus produktivitás (*qp*). A maximális produktivítás elérése érdekében első lépésként szükséges egy optimális növekedési tulajdonságokkal rendelkező, nagy produktivitású sejtvonallétrehozása, majd a következő lépés a folyamat paramétereinek optimalizálása, mint a *pH*, *pO₂*, hőmérséklet, ozmolalitás és a megfelelő médium kiválasztása (Yu *et al.*, 2011). Az irodalom számos lehetőségről számol be, mellyel növelhető egy tenyészet specifikus produktivitása, például a tenyésztési hőmérséklet eltolása alacsonyabb hőmérséklet irányába (Fox *et al.*, 2005), magas ozmolalitás (Zhu *et al.*, 2005) stb. Ezen faktorok habár pozitív hatással vannak

a specifikus produktivitásra, ugyanakkor gyakran gátolják a sejtnövekedést, így összességében nem növelik a termék koncentrációt (Yu *et al.*, 2011).

A tenyésztet hőmérséklete egy rendkívül fontos környezeti paraméter, amely befolyásolja a sejtek növekedését és fehérje termelését. Ahogyan a legtöbb emlős sejté, a CHO sejtek optimális tenyésztési hőmérséklete is 37 °C körül van. Annak ellenére, hogy a tenyésztet hőmérsékletének 37 °C alá történő levitele a specifikus növekedési sebesség csökkenését eredményezi, pozitív hatása is van, ugyanis az alacsonyabb hőmérséklet révén hosszabb ideig lehet magasabb viabilitást fenntartani, valamint megnő a sejtek specifikus produktivitása is. Számos tanulmány kimutatta, hogy a hőmérséklet alacsonyabb értékre való eltolása csökkenti a sejtek növekedési sebességét, ezzel egyidejűleg a növeli produktivitást (Becerra *et al.*, 2012; Sunley & Butler, 2010, Yee *et al.*, 2009), ezen megfigyelés azonban nem általánosítható, az irodalomban ettől eltérő hatásról is olvashatunk (Kim, 2007).

A tenyésztési paraméterek optimalizálásakor a *pH* helyes megválasztása is fontos feladat, a sejtek növekedésére és produktivitására is nagy hatással van ezen paraméter. A *pH* változtatása ezen felül a metabolizmust is képes befolyásolni, ami a sejtek által termelt fehérjék szerkezetére is hatással lehet (Osman, 2001). A *pH* hatása azonban szintén nem általánosítható minden sejtenyésztetre, az irodalom eltérő *pH* optimumokról számol be (Yoon, 2004; Borys, 1993). Összefoglalva elmondható, hogy a tenyésztet hőmérsékletét és *pH* értékeit adott sejtvonalra kell optimalizálni a maximális specifikus produktivitás elérése érdekében.

A mAb-termelő emlőssejtes fed-batch tenyésztetek produktivitása az elmúlt évek során nagymértékben növekedett (Birch & Racher, 2006). A produktivitás növelésben kulcsszerepet játszó faktorok egyike az egyre nagyobb produktivású, és jó növekedési karakterisztikával rendelkező sejtvonalak hozzáférhetősége, továbbá a médium és feed-stratégia egyre mélyebb megértése, melynek segítségével magasabb sejtkoncentráció és viabilitás érhető el a bioreaktoros tenyésztetekben (Shukla & Thömmes, 2010). Számos feed-stratégiát fejlesztettek már ki korábban az ipari fed-batch tenyésztetekben az optimális tápanyag-ellátás érdekében, hogy megfelelő sejtnövekedést és produktivitást érjenek el, habár a növekedés/produktivitás és a tápanyag-igények közötti kapcsolat még nem teljesen ismert (Sheikholeslami *et al.*, 2014). A nagy produktivitás eléréséhez a kulcs a tápanyag limitáló komponenseinek azonosítása és egy kémiaiailag jól definiált – a sejtnövekedést és a termék-szekréciót támogató – médium megalkotása (Shukla & Thömmes, 2010).

2.4.1. A feed-összetétel jelentősége

A mAb-termelő rendszerekben a maximális termék-hozam elérése érdekében fontos a tápanyagok megfelelő adagolása. A növekedést és a produktivitást nagymértékben befolyásolja a tápanyagok hozzáférhetősége, és a toxikus metabolitok jelenléte a tenyészetben (Sheikholeslami *et al.*, 2014).

Az aminosavak – különös tekintettel az esszenciális aminosavakra – kulcs-tápanyagok, befolyásolják a sejtkoncentrációt, és a termék titert, ezért szükséges ezen aminosavak koncentrációjának és arányának optimális beállítása a megfelelő termék-hozam elérése érdekében (Schaub *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2010). Schaub és mtsai. fed-batch tenyészetekben vizsgáltak magas produktivitású CHO sejteket, és fedeztek fel korrelációt számos aminosav tenyészetben mért koncentrációja (Met, Thr, His, Phe, Arg, Ser, Asp, Gly, Glu, Asn) és a termék koncentrációja között (Schaub *et al.*, 2012). Yu és mtsai. azt találták, hogy a specifikus produktivitás drámai csökkenése (közel nullára) jól korrelál a tirozin kimerülésével, mely kulcsfontosságú aminosav a fehérje szintézisben (Yu *et al.*, 2011).

2.4.1.1. Feed-optimalizálás

A médium összetételének optimalizálása a tenyészet növekedésének és specifikus produktivitásának növelésének érdekében egy jól alkalmazható megközelítés az ipari sejtenyésztési folyamatok optimalizálása során (Vijayasankaran *et al.*, 2009).

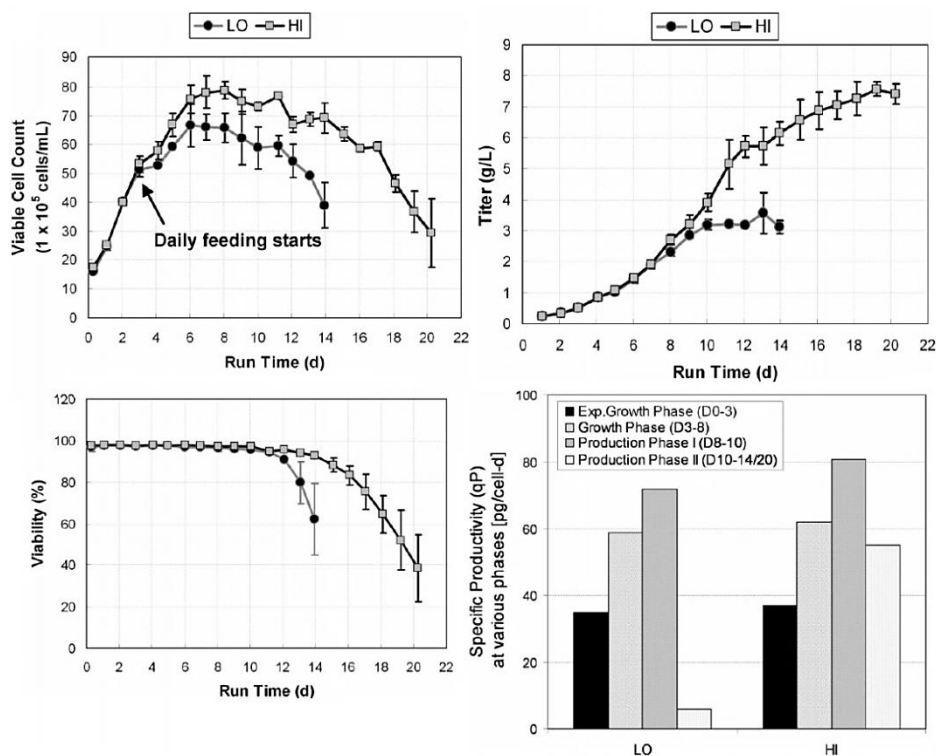
Az optimális feed összetétel (minőségi és mennyiségi összetétel) meghatározó az emlőssejtes tenyészetekben. A nagy mennyiségű glutamin és glükóz gátló hatású lehet a növekedésre és produktivitásra, a toxikus metabolitok (lakát és ammónia) felhalmozódása által (2.3 fejezet). Ezen metabolitok felhalmozódásának minimalizálása érdekében a glükóz és glutamin mennyiségének minimalizálása az egyik alappillére számos fed-batch kontroll stratégiának (Dowd *et al.*, 2001; Takuma *et al.*, 2007; Maranga & Goochee, 2006; Kim *et al.*, 2013).

A kulcsfontosságú aminosavak kimerülése nagymértékben akadályozza a sejtnövekedést, csökkenti a viabilitást és a produktivitást. Azonban a tápanyagok koncentrált jelenléte is lehet gátló hatású a sejtek növekedésére az ozmolalitás növelésén keresztül (Lu *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2011). Így tehát egy kiegyensúlyozott médium összetétel meghatározó jelentőségű lehet a magas titer elérése érdekében. Habár az irodalom számos esetről számol be, amikor sikerült magas titert elérni a médium-összetétel optimalizálásával, a kapcsolat a tápanyag-kiegészítés és a specifikus produktivitas között még nem teljesen ismert (Yu *et al.*, 2011).

2.4.1.2. Rátáplálási-stratégiák

A feed összetétel mellett a rátáplálási stratégia is befolyásolhatja a sejtek produktivitását. A mAb titer növelésére irányuló médium-optimalizáláson alapuló módszereket két csoportba sorolhatjuk az alkalmazott feed-adagolási gyakoriságuk alapján: folytonos, illetve előre meghatározott intervallum szerinti (bolusz) feed-adagolási stratégiák. Lu és mtsai. két különböző termelékenyséű CHO klón („A” és „B”) tenyészetben vizsgálták ezen stratégiák közötti különbségeket. Azt tapasztalták, hogy az „A” klón esetén az eltérő feed-stratégia nem okozott jelentős változást a növekedésben és a titerben, azonban mindhárom tenyészetben lecsökkent a kulcsfontosságú aminosavak (Cys, Asn, Tyr) koncentrációja a tenyésztés késői szakaszában, ami lelassíthatta a termékképzést ebben a szakaszban. A „B” klón esetén már látható volt a különbség a feed-stratégiák között mind a VCD-ben, mind a titerben, a folytonos feed-adagolás bizonyult a legkedvezőbbnek. A „B” klónnál továbbá egy optimalizált feed-et is alkalmaztak, amely esetében javulást tapasztaltak a két paraméter (VCD, titer) értékeiben, azonban a feed-stratégiák összevetésénél itt is jobbnak bizonyult a folytonos rátáplálós módszer (Lu *et al.*, 2013).

Yu és mtsai. két különböző feed-médiummal - egy magas (HI), és egy alacsony (LO) tápanyag-koncentrációjúval - végeztek kísérleteket annak érdekében, hogy tanulmányozni tudják a tápanyag-adagolás hatását a tenyészetek produktivitására. A fő hipotézisük az volt, hogy a transláció lehet a szűk keresztmetszet a produktivitás szabályozásában a tenyésztés 9-14. napjai között, mikor a tirozin szint kritikus érték alá csökken, ezzel megáll (nagymértékben lecsökken) a fehérje termelés. A hirtelen ozmolalitás növekedés elkerülése érdekében a harmadik naptól kezdve naponta kisebb mennyiségben adagolták a tápoldatokat a két azonos tenyészethez. Az alacsony oldhatóságú aminosavakat (tirozin, cisztein) külön oldatokban adagolták a HI feedet kapott tenyészetnél amennyiben ezen aminosavak koncentrációja lecsökkent. Az így kapott VCD, viabilitás, titer és *qp* adatokat a [2. ábra2. ábra](#) szemlélteti (Yu *et al.*, 2011).



2. ábra: Eltérő koncentrációjú feedek hatása a VCD-re, titerre, viabilitásra és a μ -re (Yu *et al.*, 2011)

A teljes növekedési profil felbontható exponenciális-növekedési (0-3. nap), növekedési (3-8. nap), és termelői (I: 8-10. nap; II: 10-20. nap) fázisokra. A kísérleteknél azt tapasztalták, hogy az első termelői fázisban mindkét tenyészet specifikus produktivitása hasonlóan magas volt, azonban a II. fázisba lépve a LO feed-médiumot kapott tenyészet specifikus produktivitása drasztikusan lecsökkent (ahogyan ezt a titer-adatok is prediktálják). Ezen megfigyelésre alapozva feltételezhető, hogy a magas specifikus produktivitás a II. növekedési fázistól (8. naptól) a megfelelő tápanyag mennyiség adagolásával tartható fent (Yu *et al.*, 2011).

Yu és mtsai. tehát igazolták, hogy a fokozott tápanyag kiegészítés hatásos a sejtnövekedés elősegítésében, és növeli a tenyészet élettartamát, amennyiben megfelelő módon adagoljuk, elkerülve a túl magas ozmolalitást. Azon hipotézist is sikerült alátámasztaniuk, miszerint a tirozin kimerülésével leáll a fehérje-termelés, hiszen ezen aminosav kulcsfontosságú a fehérje-szintézisben. Mindezt összegezve elmondható, hogy a megfelelő tápanyag összetétel megválasztásával és a megfelelő rátáplálási stratégia alkalmazásával elérhető a tenyészetek produktivitásának jelentős növekedése (Lu *et al.*, 2013; Yu *et al.*, 2011).

3. CÉLKITŰZÉS

Összefoglalva a 2.4 fejezetben leírtakat, látható, hogy az irodalomban számos kísérletet tettek már a sejtek produktivitásának növelésére. Egyes módszerek a *pH* és a hőmérséklet szabályozásán alapulnak, de számos módszer irányul a megfelelő feed-összetétel kialakítására, illetve a megfelelő mértékű feed-rátáplálásra.

Több kutatócsoport tapasztalt aminosav-limitációt fed-batch CHO tenyészetekben, melyet a megfelelő aminosavak pótlásával sikerült megszüntetniük. Ezekben a publikációkban az aminosav limitációk a tápanyagok kimerülésének voltak köszönhetőek, a kutatóknak nem volt céljuk a limitáció direkt előidézése.

Kísérleteink során egy CHO sejtvonalt két különböző klónját tenyésztettük bioreaktorokban, és vizsgáltuk a köztük lévő fiziológiai illetve produktivitásbeli különbségeket. A szükséges szén-, és nitrogénforrást tartalmazó feedet kétnaponta boluszban adagoltuk a tenyészetekhez, az esszenciális aminosavakat tartalmazó feedet pedig eltérő módon és mértékben adagoltuk, ezzel célunk volt a rátáplálási stratégiák (bolusz vs. folytonos) hatásának összehasonlítása.

Kutatómunkánk során az irodalomban leírt eredményekre és korábbi kísérletek tapasztalataira támaszkodva kísérletet tettünk a tenyészetekben tápanyag-limitáció előidézésére az esszenciális aminosav rátáplálás sebességének változtatása mellett, majd ugyanezen módszerrel a limitáció feloldására. Munkánkban újdonságnak számít, hogy direkt idéztünk elő tápanyag limitációt a tenyészetekben, továbbá hogy az esszenciális aminosavak adagolását az O₂ tömegáram szabályzó (MFC) jelére támaszkodva szabályoztuk, tehát on-line követtük nyomon a folyamatot, a fellépő változásokra így a kísérlet közben, valós időben tudtunk reagálni.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. FED-BATCH KÍSÉRLETEK VÁZLATA

A kísérleti munka során mAb-termelő CHO klónok (*a* és *b*) metabolizmusát és termelékenységét vizsgáltuk fed-batch fermentációkban a tenyészetek hőmérsékletének és *pH*-jának, valamint az adagolt feed összetételének és mennyiségének változtatása mellett.

A *b* klónt alkalmaztuk a korábbi kísérletek során, az *a* klón a *b* genetikailag módosított változata.

A kísérletek a beoltástól számított 13 napig futottak, *pH*=7,2 és *T*=37°C kezdeti beállítás után az összes kísérletnél a 3. napon *pH* shiftet (7,2 → 6,9), továbbá az 1.1_a kísérletben az 5. napon hőmérséklet shiftet (37°C → 33°C) alkalmaztunk. Két kísérleti kört végeztünk, az első körben 4 kísérletben (1.1_a; 1.2_a; 1.3_b; 1.4_a) a sejtek metabolizmusát, és a feed adagolási módszerek (bolusz vs. folytonos) hatásait vizsgáltuk. A második körben 3 kísérletet végeztünk (2.1_a; 2.2_a; 2.3_b), ahol már az aminosav limitáció elérése és szabályozása, és ezzel a specifikus produktivitás befolyásolása volt az elsődleges cél.

A tenyészetekben kétkomponensű feedet (feedA és feedB) alkalmaztunk, melyeket eltérő napokon és mértékben adtunk a tenyészetekhez, továbbá valamely kísérletnél L-ciszteint illetve L-glutamint is adagoltunk. Ezeket és az adagolásuk időpontját illetve módját a 2. táblázat foglalja össze.

2. táblázat: A tenyészetekhez adott feed-ek és egyéb aminosavak

Kísérlet azonosító	Klón	FeedA	FeedB	L-Cys (10 mM)	L-Gln (10 mM)	Jelölés
1.1_a	<i>a</i>	3.naptól 2 naponta	Bolusz (3.nap) + Folytonos (9.nap-)	-	-	--■--
1.2_a	<i>a</i>	3.naptól 2 naponta	Bolusz (3.nap) + Folytonos (9.nap-)	-	-	--■--
1.3_b	<i>b</i>	3.naptól 2 naponta	Bolusz (~feedA)	-	-	--◇--
1.4_a	<i>a</i>	3.naptól 2 naponta	Bolusz (~feedA)	-	-	--◇--
2.1_a	<i>a</i>	4.naptól 2 naponta	Folytonos (7.nap-)	3., 5. nap (feedA-ban)		--■--
2.2_a	<i>a</i>	3.naptól 2 naponta	Folytonos (7.nap-)	3., 5. nap (feedA-ban)		--■--
2.3_b	<i>b</i>	3.naptól 2 naponta	Folytonos (7.nap-)	3., 5. nap (feedA-ban)		--◇--

A kétkomponensű feed lényege az volt, hogy az „A” komponens tartalmazta a szükséges szén-, és nitrogén-forrásokat, a „B” komponensben pedig három esszenciális aminosav (Cys, Trp, Tyr) volt feloldva, így ezen aminosavak koncentrációja a tenyészetben szabályozhatóvá vált (4.3 fejezet).

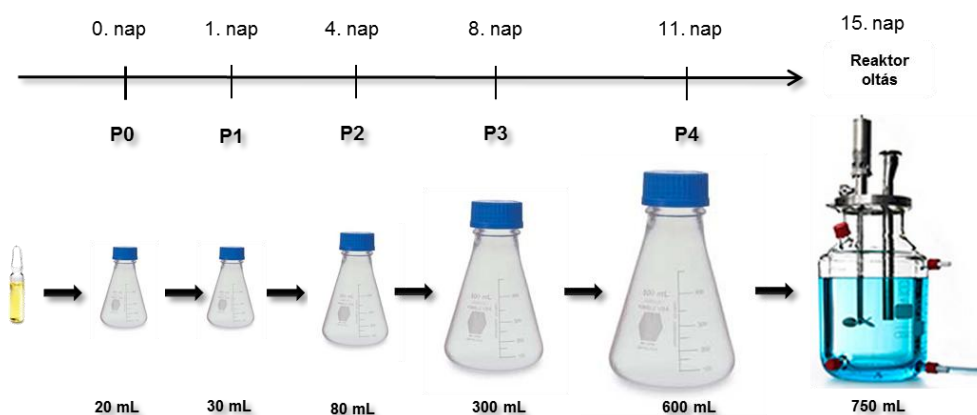
A reaktorokban elhelyezett szondák (pH, hőmérséklet, pO_2 , kapacitancia) lehetővé tették az on-line adatgyűjtést, továbbá a reaktorokból kezdetben naponta, majd a kísérletek 7. napjától kezdve naponta kétszer vettünk mintát, melyekből at-line és off-line méréseket végeztünk (4.4 fejezet). A kísérletek beállításait a 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat: Kísérletek összefoglaló táblázata

Paraméter	1. kísérleti kör	2. kísérleti kör
FeedB	bolusz / folytonos	folytonos
Bolusz feedA	3. nap-	3. nap-/4. nap-
FeedA hígítás	-	1:2
Bolusz feedB a 3. napon	igen	Cys bolusz a 3. napon
FeedB hígítás	1:10	1:25
Gln a feedA-ban	nem	10 mM/nem
Kezdő térfogat	700 ml	750 ml

4.2. INOKULUM ELŐKÉSZÍTÉS

A kísérletek során használt sejteket RCB ampullákban tároltuk -80°C -on. A sejteket a kísérletek előtt két héttel Erlenmeyer-lombikokban, ActiCHO tápoldatban vettük fel (GE Healthcare), melyet kiegészítettünk 5 mg/l inzulinnal (GE Healthcare) és 8 mM L-glutaminnal (Life Technologies). A tenyészeteket ezután 3-4 naponta passzáltuk egyre nagyobb léptékben (3. ábra) $0,3 \times 10^6$ sejt/ml kezdeti sejtkoncentrációval. A lombikokat 37°C -on rázattuk, 5% CO_2 tartalmú levegőben, 100-110 rpm-es orbitális keverési sebességgel.



3. ábra: Inokulum előkészítés

4.3. KÍSÉRLETEK 1L-ES REAKTOROKBAN

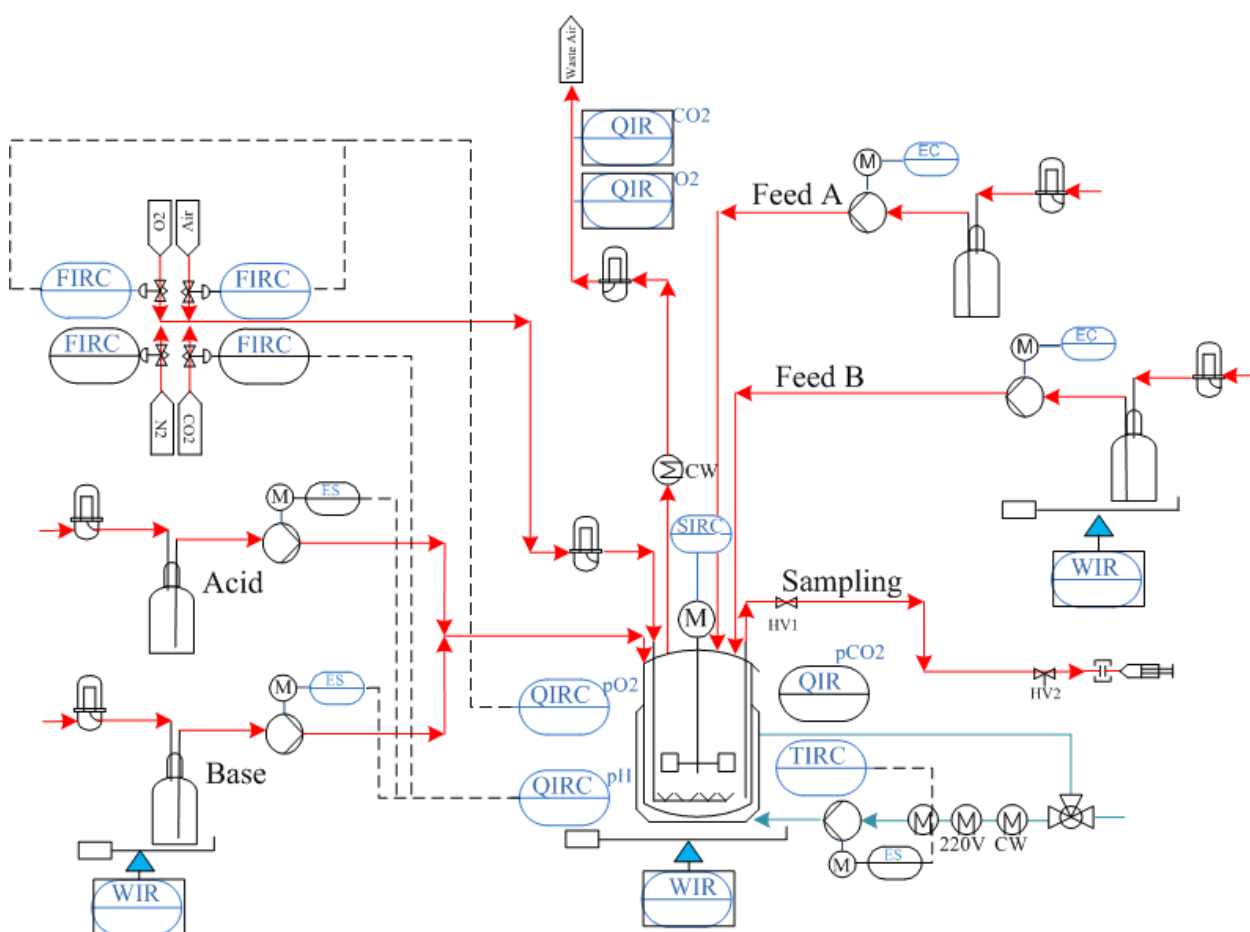
A fermentációkat 1 l hasznos térfogatú bioreaktorban végeztük (Sartorius AG), melyekben on-line pH , hőmérséklet, pO_2 és ABER szondákat helyeztünk el. A tenyésztési paramétereket egy Biostat BPlus Twin DCU szabályozta (Sartorius AG).

A reaktorokat P4-es inokulummal oltottuk be $0,5 \times 10^6$ sejt/ml kezdeti sejtkoncentrációval, az alkalmazott tápoldat itt is L-glutaminnal és inzulinnal kiegészített ActiCHO volt. A reaktorokban a pH -t automata szabályzó rendszer tartotta a megadott értéken ($\pm 0,02$ tartományban), 0,5 M-os Na_2CO_3 és 10%-os H_3PO_4 oldatok adagolásával. Az oldott oxigén szintet szintén a szabályzó rendszer tartotta a telített érték 40%-án, a levegő:oxigén arány változtatásával, állandó gázáram mellett. A fermentlevet a kísérletek alatt 125 rpm fordulatszámmal kevertettük. Szükség esetén a habzás elkerülése végett habzásgátlót adagoltunk a tenyészetekhez (FoamAway, Life Technologies).

Az első kísérleti körben a feedA-t a 3. naptól kétnaponta adtuk a tenyészetekhez a fermentlé-térfogat 4%-ának megfelelő mennyiségben. A második kísérleti körben a feedA-t kétszeresére hígítottuk, hogy a mintavételek során a reaktorokból elvett folyadékmennyiséget a rátáplálással pótoljuk. Ennek megfelelően a második kísérleti körben a fermentlé-térfogat 8%-ának megfelelő mennyiségű feedA-t adtunk a tenyészetekhez.

A bioreaktorokba adagolt feedB mennyiségét gravimetriásan határoztuk meg, mérlegek segítségével (MS8001SE, Mettler Toledo). Az első kísérleti körben 1:10 hígításban alkalmaztuk, azonban ez túl töménynek bizonyult (5.4 fejezet), így a második kísérleti körnél

1:25 arányban hígítottuk. Az első kísérleti körben minden tenyészethez a 3. napon bolusz feedB-t adtunk, majd az 1.3_b és 1.4_a kísérleteknél továbbra is 2 naponta boluszban, míg az 1.1_a és 1.2_a kísérleteknél a 9. naptól folytonos rátáplálással adagoltuk a feedB-t a tenyészetekhez. A második kísérleti körnél minden kísérletben a 7. naptól kezdve folytonos rátáplálást alkalmaztunk. A folytonos rátáplálás sebességét perisztaltikus pumpák (101U/R, Watson-Marlow) segítségével szabályoztuk, a pumpák fordulatszámát manuálisan változtattuk a kísérletek során (5.4 fejezet). A bioreaktorok kísérleti elrendezését a 4. ábra mutatja.



4. ábra: Bioreaktorok kísérleti elrendezése

4.4. MÉRT PARAMÉTEREK

4.4.1. On-line mért paraméterek

A fermentlé térfogatát gravimetriás módszerrel határoztuk meg, a reaktorokat a kísérletek ideje alatt mérlegekre helyeztük (BB30, Mettler Toledo). A gravimetriás mérések eredményeit a kísérletek végén volumetrikus méréssel ellenőriztük, a mérések hibája minden esetben 5%-on belülre esett. A kísérletek során adagolt oldatok (1M-os glükóz, 0,5M-os Na_2CO_3 , 10%-os H_3PO_4 oldatok) mennyiségét szintén gravimetriásan mértük, mérlegek segítségével (MS8001SE, Mettler Toledo). A mérlegek valamint a reaktorokban elhelyezett szondák jeleit a Biostat BPlus DCU-k továbbították a SCADA adatgyűjtő és tároló rendszernek. A kísérletek során továbbá on-line követtük nyomon az O_2 MFC jelét. Jelenleg nincs megfelelő számítási módszerünk az oxigén-felvétel pontos meghatározására, így az O_2 MFC jelet használtuk a tenyészet oxigén-felvételi sebességének indikátoraként.

4.4.2. At-line és off-line mért paraméterek

Az at-line és off-line mérésekhez a fermentléből a kísérletek első 7 napján naponta egyszer, majd naponta kétszer vettünk mintát (a mintavételek száma a kísérletek közben kapott eredményektől is függött). A mintavételkor levett minta egy részéből *in situ pH* mérést végeztünk (s47 SevenMulti *pH*-mérő, Mettler Toledo), melynek eredménye alapján szükség esetén recalibrációt végeztünk az adott DCU-n. Ezután a minta oldott CO_2 szintjét mértük meg (ABL80 vérgáz analizátor, Radiometer). Az élő sejt denzitást (VCD), és a viabilitást tripánkék festékkel kirekesztéses vizsgálattal határoztuk meg automata sejtszámláló berendezés segítségével (Countess, Life Technologies). A mintából továbbá glükóz-koncentrációt is mértünk (Accu-Chek, Roche). Amennyiben a fermentlé glükóz tartalma 10 mM alá csökkent, 1M-os glükóz oldat adagolásával 25mM-ra állítottuk be. A maradék mintát 3000 rpm-en lecentrifugáltuk (Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen), a felülúszók egy részéből ozmolalitást mértünk (Advanced Model 2020, Advanced Instruments), a maradékot pedig - 20°C-on tároltuk további mérésekig.

A kísérletek végeztével a lefagyasztott mintákból glükóz, glutamin, glutamát, laktát és ammónia koncentrációt mértünk Cedex BioHT készülék segítségével (Roche), az aminosav koncentrációk pedig NMR spektroszkópiával (Bruker 500 MHz Avance III, Bruker Biospin) lettek meghatározva. A termékkoncentrációt affinitás kromatográfiás módszerrel határoztuk

meg Shimadzu LC-2010C HPLC készülékkel (Shimadzu), Applied Biosystems Poros A/20 Protein A töltetű oszlopon (Applied Biosystems).

4.5. SPECIFIKUS ÉRTÉKEK MEGHATÁROZÁSA

A kísérletek során kapott adatokból MS Excel segítségével specifikus változókat számoltunk az alábbi képletek felhasználásával.

$$X = VCD \cdot V_{fermentlé} \quad (1)$$

ahol: X a sejttömeg [db sejt]

VCD az élő sejt denzitás [sejt/dm³]

V a térfogat [dm³]

$$\mu = \frac{\frac{dx}{dt}}{X} \quad (2)$$

ahol μ a fajlagos növekedési sebesség [h⁻¹]

X a sejttömeg [db sejt]

t az idő [h]

$$q_p = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt}, \quad q_s = \frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt} \quad (3)$$

ahol q a specifikus szubsztrát fogyasztási/ metabolit termelési/termék termelési sebesség [mol/(sejt·nap)], [pg/(sejt·nap)]

S a szubsztrát, P a termék/metabolit mennyisége [mol]

t az idő [h]

X a sejttömeg [db sejt]

$$\text{volumetrikus produktivitás} = \frac{1}{V} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (4)$$

ahol P a termék mennyisége [pg]

t az idő [nap]

V a térfogat [dm³]

$$C_s = C_{s,t-1} + (V_t \cdot c_t - (V_{t-1} \cdot C_{t-1} + V_{feed} \cdot C_{s,feed})) \quad (5)$$

ahol C_s az akkumulált/felvett metabolit/szubsztrát mennyisége [mol]

V a térfogat [dm³]

c a koncentráció [mol/dm³]

$$Y_{\frac{C_{S,i}}{C_{S,j}}} = \frac{C_{S,i}}{C_{S,j}} \quad (6)$$

ahol Y az S_i szubsztrát S_j szubsztrátra vonatkoztatott hozama [C-mol/C-mol]

C_S az akkumulált/felvett metabolit/szubsztrát mennyisége [mol]

Két mintavétel között 12 vagy 24 óra telt el. A fenti változókat 24 órás időintervallumokra számoltuk ki, így kiküszöbölhetjük az elsődleges mérési hibákból adódó hibaterjedés hatását.

5. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

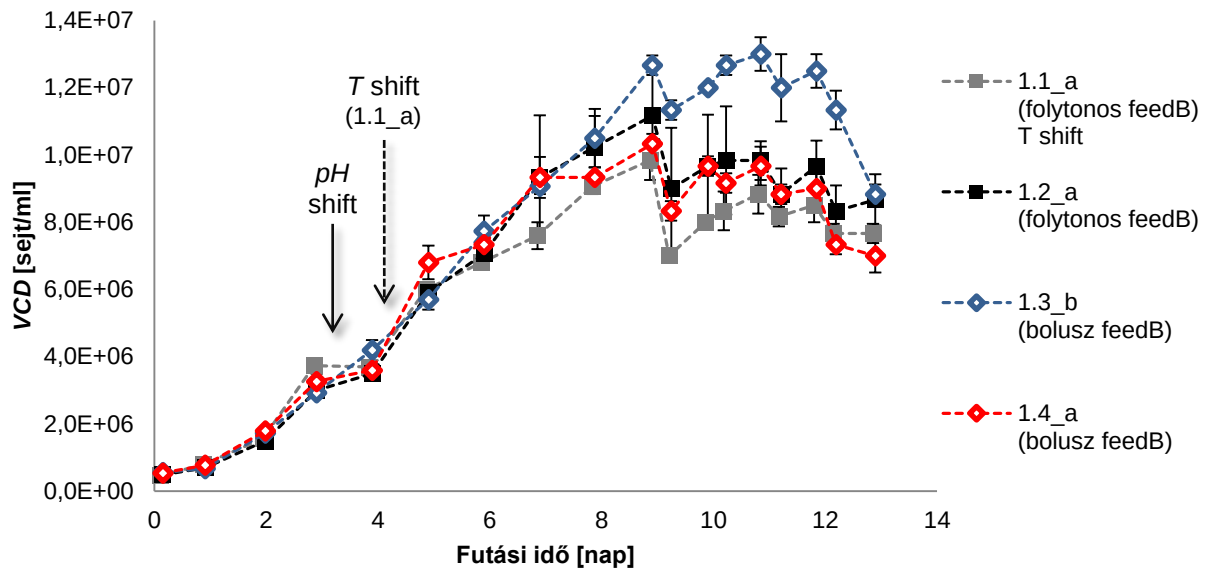
5.1. KÍSÉRLETEK FELÉPÍTÉSE

Az elvégzett kísérletek azonosítóját és a feed-adagolás időpontjait illetve módjait a 2. táblázat tartalmazza. A feedA-t minden esetben előre meghatározott térfogatban és időpontban adtuk a tenyészetekhez, a feedB-t pedig az 1.3_b és 1.4_a kísérleteknél boluszban, az 1.1_a és 1.2_a kísérleteknél a 9. naptól kezdve folytonosan, a 2.1_a, 2.2_a és 2.3_b kísérleteknél pedig a 7. naptól kezdve folytonosan, eltérő sebességgel adagoltuk. Hőmérséklet shiftet csak egy kísérletnél alkalmaztunk, ahol a shift hatására a sejtek specifikus produktivitásának csökkenését tapasztaltuk. Mivel a kísérleti munka célja a qp kontrollálása megfelelő feed-stratégia alkalmazása mellett, így a további kísérleteknél nem végeztünk hőmérséklet-shiftet. Az irodalom alapján 37°C-on a pH -nak nincs általánosan leírható hatása a qp -re, adott tenyészetre kell optimalizálni (2.4 fejezet). Az általunk végzett kísérletek mindegyikénél $pH=7,2$ kezdeti beállítás után a 3. napon pH shiftet végeztünk, $pH=6,9$ -re toltuk el a tenyészetek pH -ját. A 3. napi pH shift a korábbi kísérletekben is alkalmazott, standard technológiai lépés.

5.2. SEJTEK FIZIOLÓGIAI JELLEMZŐINEK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

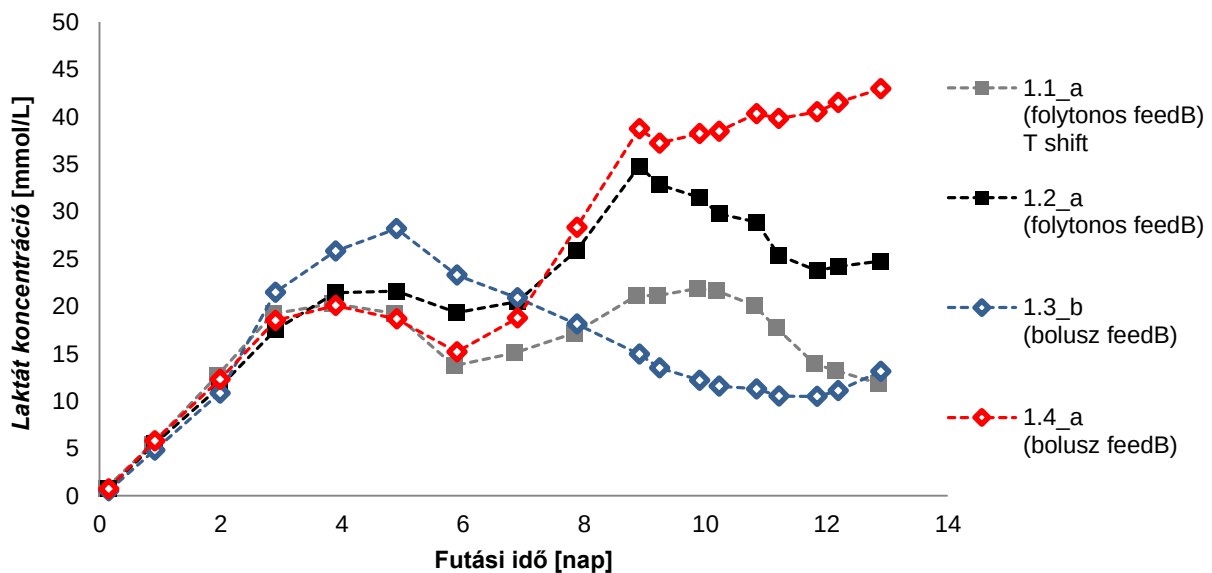
A célkitűzések között elsőként szerepel a két CHO klón (a és b) fiziológiájának illetve a különböző feed-stratégiák (bolusz vs. folytonos) összehasonlítása. Ezen összehasonlítások elvégzésére az első kísérleti kör adataiból nyert VCD , a laktát koncentráció ($cLac$), a specifikus laktát termelési/fogyasztási sebesség ($qLac$), a laktát-glükóz hozam ($Y_{Lac/Glc}$), valamint a specifikus glutamin termelési/fogyasztási sebesség és ammónia koncentráció ($qGln$, cNH_3) görbéket vettük alapul.

Az első kísérleti kör VCD görbéit az 5. ábra foglalja össze. A b klónnal beoltott reaktorban magasabbak voltak a sejtszámok, ami a klónok közti különbségből fakadhat.



5. ábra: VCD értékek a futási idő függvényében – első kísérleti kör
(a hibajelek a párhuzamos mérések eredményeiből számolt tapasztalati szórás értékeket mutatják)

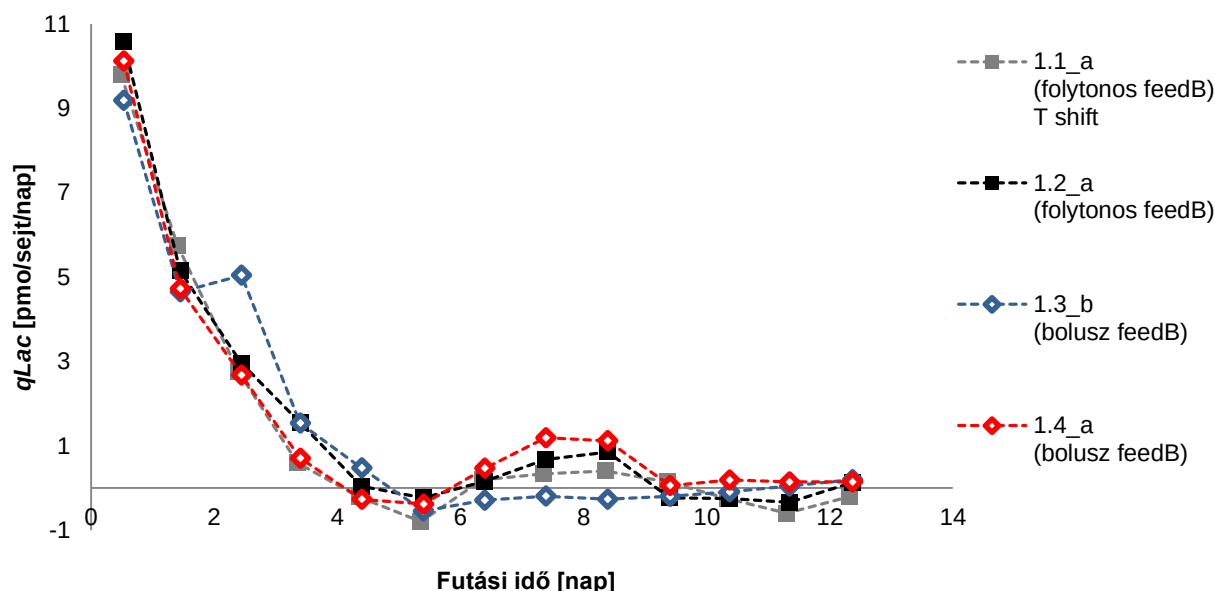
Az első kísérleti körhöz tartozó laktát koncentráció görbéket a 6. ábra mutatja be. A görbék lefutása időben változó, ami azt mutatja, hogy a sejtek laktát-termelésből átváltottak laktát-fogyasztásba, majd egyes kísérleteknél újból visszaváltottak termelésbe. A laktát-profilok eltérőek voltak ugyanazon klónnal végzett kísérletek között is, tehát a laktát metabolizmus karakterisztikája nemcsak klón-, hanem környezetfüggő is.



6. ábra: Laktát koncentrációk a futási idő függvényében - első kísérleti kör

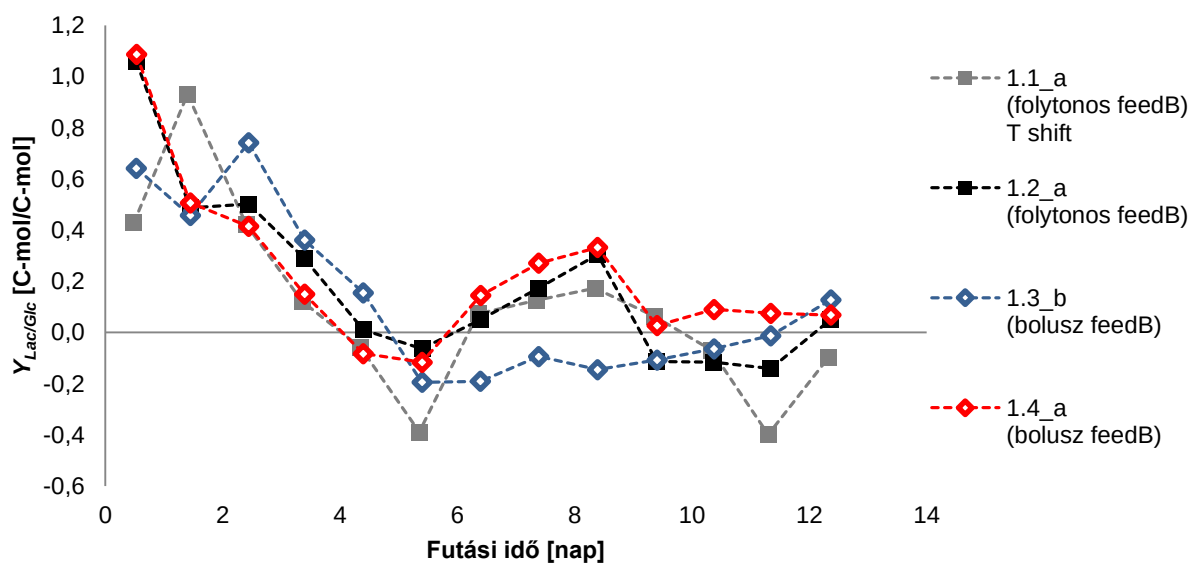
Az *a* klón esetén annál a kísérletnél, melynél hőmérséklet-shiftet végeztünk (1.1_a) alacsonyabban fut a *cLac* görbe, mint a másik két, *a* klónnal végzett kísérletben (1.2_a; 1.4_a). Az 1.1_a és az 1.2_a tenyésztéknél egyaránt folytonos feedB rátáplálást alkalmaztunk,

ami azt mutatja, hogy a folytonos feedB adagolás esetén a hőmérséklet shift hatására megváltozik a laktát metabolizmus karakterisztikája. A laktát metabolizmus mélyebb megértése érdekében a számított q_{Lac} és $Y_{Glc/Lac}$ értékeket is ábrázoltuk a futási idő függvényében.



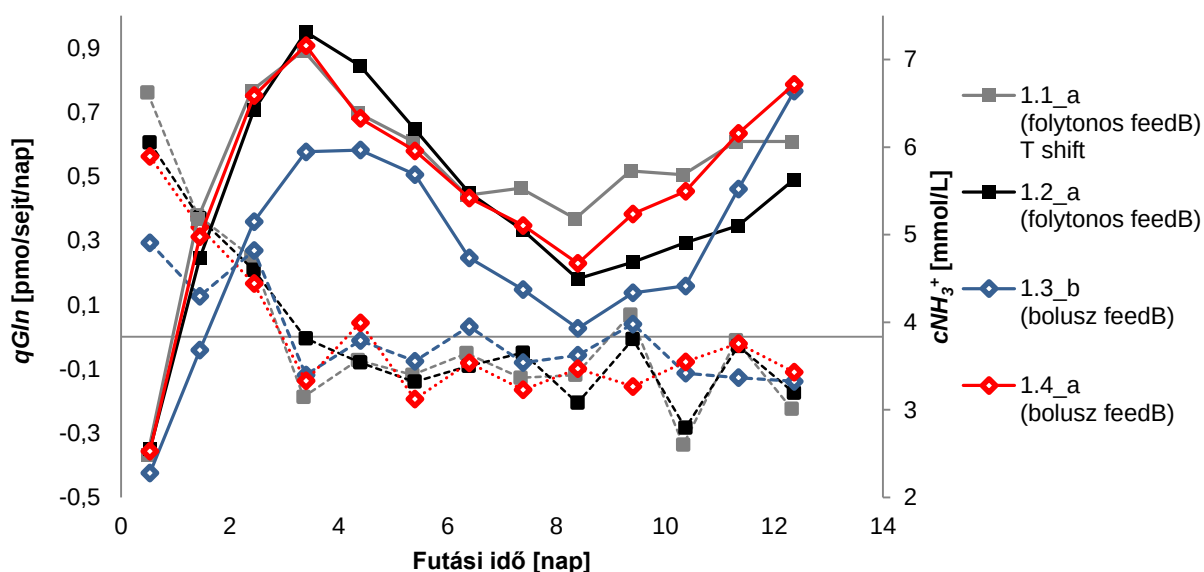
7. ábra: q_{Lac} adatok a futási idő függvényében - első kísérleti kör

A q_{Lac} görbéken a specifikus laktát termelési/fogyasztási sebesség látható a futási idő függvényében. A 7. ábrán jól követhető, hogy a sejtek mikor termelnek ($q_{Lac} > 0$), illetve fogyasztanak ($q_{Lac} < 0$) laktátot. Az $Y_{Glc/Lac}$ görbéken a sejtek glükózra vonatkoztatott laktát hozama látható a futási idő függvényében (8. ábra).



8. ábra: $Y_{Lac/Glc}$ adatok a futási idő függvényében – első kísérleti kör

Az $Y_{Lac/Glc}$ görbék az első 5 napon hasonlóan futnak, ezt követően a klónok között és azonos klónnal végzett kísérletek között is megfigyelhetők különbségek. A $Y_{Lac/Glc}$ görbék alapján az a klónok (1.1_a, 1.2_a, 1.4_a) a 6. napon a kísérleti beállításoktól függetlenül laktát termelésbe váltanak át, míg a b klón (1.3_b) ezzel ellentétben csak a tenyésztés legvégén (a 11. napon) vált át újból termelésbe. Az 1.4_a kísérletben a 6. naptól a sejtek végig laktát termelnek, míg a másik két a klónos kísérletben (1.1_a és 1.2_a) a 9. napot követően laktát fogyasztásba váltanak át.



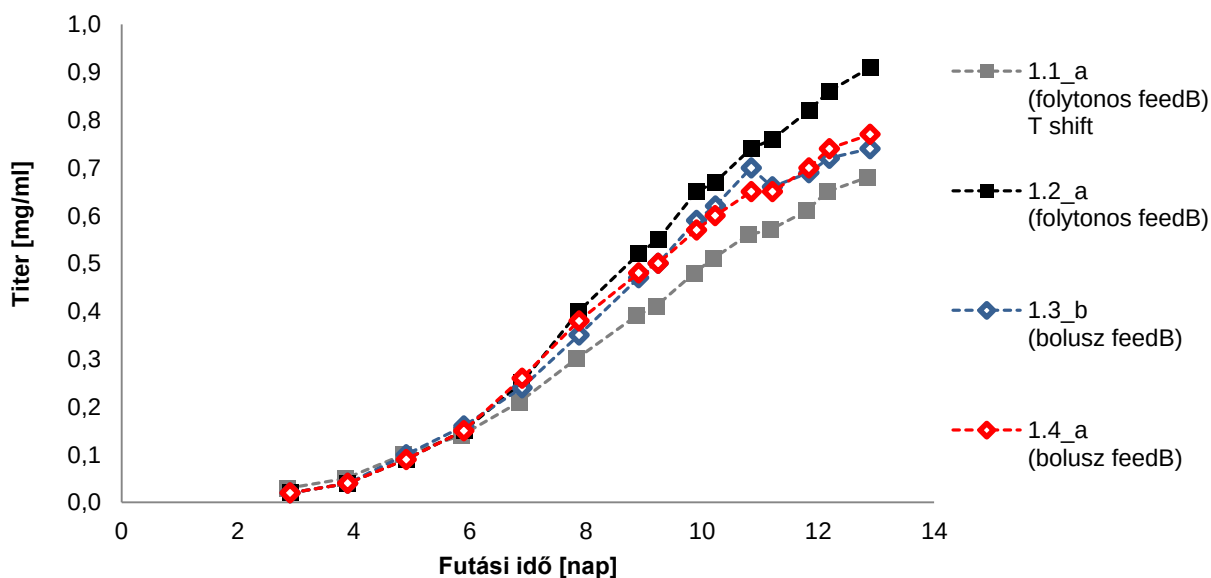
9. ábra: $qGln$ és cNH_3^+ a futási idő függvényében (...): $qGln$; (—): cNH_3^+ - első kísérleti kör

A specifikus Gln termelési/fogyasztási sebességet és a termelt ammónia koncentrációját a futási idő függvényében a 9. ábra szemlélteti. A hőmérséklet shift nem befolyásolja a $qGln$ -t, és az ammónia-profilra sincs jelentős hatása. A sejtek a felvett glutamint ammóniává alakítják át, mely gátló hatású a sejtnövekedésre (2.3 fejezet). A b klón görbéje alacsonyabb $qGln$ értékről indul az első két napon. Érdeemes megjegyezni, hogy a növekedés az első napokban hasonló volt minden kísérletben az első kísérleti körben. Ebből arra következtetünk, hogy nincs korreláció a $qGln$ és a növekedés között a tenyésztés korai szakaszában, az irodalomban leírtakkal ellentétben (2.4.1. fejezet).

Összefoglalva a sejtek metabolizmusának vizsgálatakor kapott eredményeket, azt látjuk, hogy vannak különbségek a két klón (a és b) között, azonos tenyésztési körülmények között is. Az a klón esetében az eredmények azt mutatják, hogy eltérő tenyésztési körülmények között az azonos klónnal végzett kísérletek között is adódnak különbségek a sejtfiziológiában.

Irodalmi adatok szerint a laktát metabolizmus egy fontos jellemzője a CHO sejteknek, ezért vizsgálata elengedhetetlen a klónok fiziológiai karakterizálása során. Több publikációban leírták, hogy azok a sejtek, melyek képesek laktát termelésből átváltani laktát fogyasztásba, magasabb titeret képesek produkálni, mint amelyek a fogyasztásból ismét termelésbe válnak át (2.3 fejezet). Mivel az *a* klónban végzett genetikai módosítások információink szerint csak a fehérje-expresszióra irányultak, nem vártunk különbségeket a laktát metabolizmusban. Ennek ellenére a kísérletünkben a *b* klón hosszabb ideig volt képes megtartani a laktát felvétellel jellemezhető metabolikus állapotát. Ezen megfigyelésekre alapozva azt feltételezhetjük, hogy a *b* klónnál magasabb titeret érhetünk el, mint az *a* klón esetében.

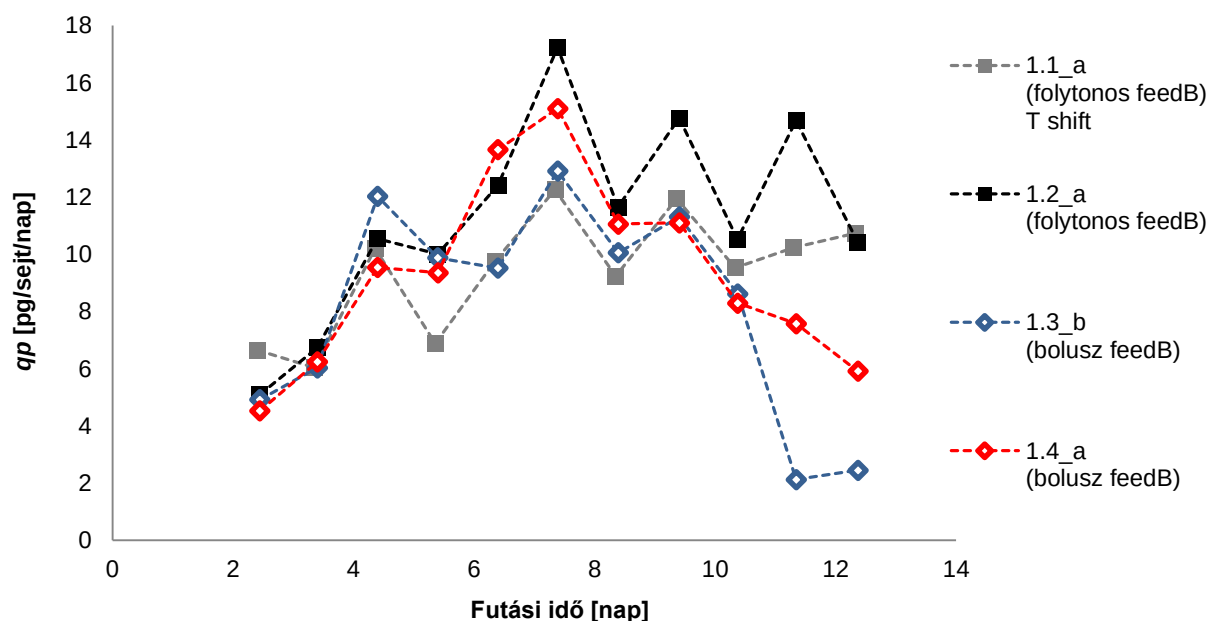
A fed-batch tenyészetekben alkalmazott kísérleti beállítások (hőmérséklet, *pH*, feed) hatását a sejtek termelékenységére a legtöbb esetben nem lehet általánosítani, hanem adott sejtvonalra kell optimalizálni (2.3 fejezet). A 10. ábra mutatja az első kísérleti kör titer értékeit. A laktát metabolizmus karakterisztikája alapján a várttal ellentétben a legmagasabb titeret az 1.2_a kísérletben értünk el, ahol az *a* klónt folytonos rátáplálás mellett tenyésztettük. Az irodalomban a laktát metabolizmus karakterisztikája és a termék titer között leírt összefüggés tehát nem alkalmazható az általunk vizsgált klónoknál, azonban itt fontos megjegyezni, hogy az *a* klón egy, a fehérje-expressziót segítő gént is tartalmaz, feltételezhetően ez okozhatja a magasabb titer értékeket.



10. ábra: Titer értékek - első kísérleti kör

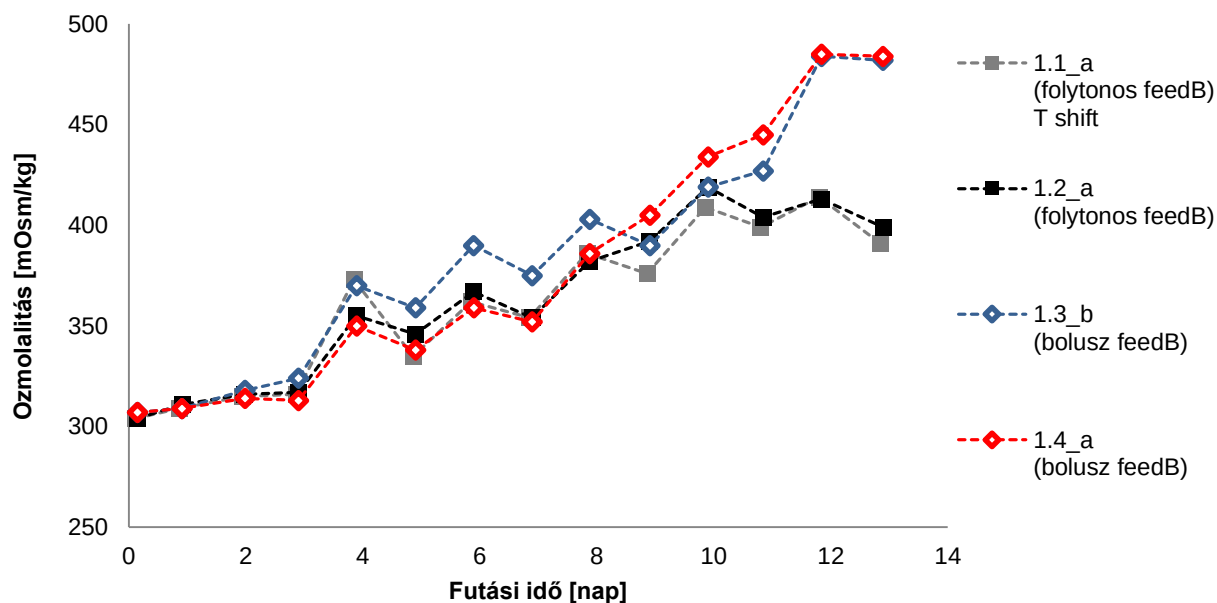
5.3. FEED-STRATÉGIÁK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

A feedB adagolási módszerek hatását az első kísérleti kör specifikus produktivitás görbéin mutatjuk be (11. ábra). Az 1.3_b és 1.4_a kísérletek görbéi alapján a feedB bolusz rátáplálásával a kísérlet végén mindkét klón esetében qp csökkenést tapasztaltunk. Ennek oka lehet az is, hogy a bolusz feedB-vel adagolt tenyészetekben a rátáplálások időpontjában az ozmolalitás ugrásszerűen nőtt, ami stresszt válthatott ki a sejtekben, aminek következtében azoknak lecsökkent a produktivitása. A folytonos feedB-vel táplált tenyészetek esetén a 9. naptól (a pumpák indításának időpontjától) sikerült stabilizálni a qp -t.



11. ábra: Specifikus produktivitás a futási idő függvényében - első kísérleti kör

Az ozmolalitás görbéket megfigyelve (12. ábra) jól látható a qp és az ozmolalitás közötti összefüggés, a 9. naptól a bolusz feedB-vel adagolt tenyészetek ozmolalitása jóval a folytonos rátáplálásos tenyészetek szintje fölé emelkedik, míg a qp (11. ábra) ugyanekkor drasztikusan lecsökken.



12. ábra: Ozmolalitás a futási idő függvényében - első kísérleti kör

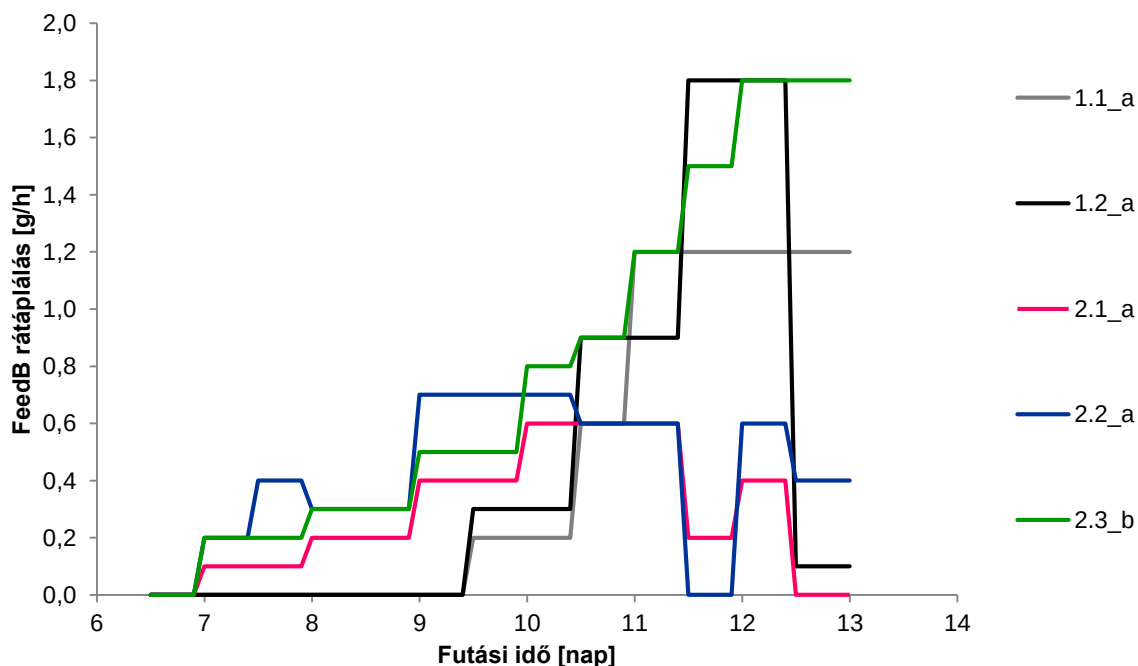
A *cLac* és *qLac* görbék alapján a különböző feed adagolási módszerek hatással vannak a sejtek metabolizmusára. A folytonos rátáplálásnál a *qp* nem csökkent le olyan mértékben, mint a bolusz feedB esetében, továbbá a folytonos rátáplálós kísérletekben a tenyészetek végén megfigyelt magasabb *qp* összhangban van az ugyanebben az időszakban megfigyelt metabolikus karakterisztikákkal (laktát felvétel/leadás). Ezen megfigyelésekre alapozva a második kísérleti körben már csak folytonos rátáplálást alkalmaztunk, ahol az adagolás mértékének változtatása mellett (pumpák fordulatszámának változtatása) a specifikus produktivitást kívántuk befolyásolni.

5.4. SEJTEK SPECIFIKUS PRODUKTIVITÁSÁNAK ÖSSZEHASONLÍTÁSA

A sejtek produktivitásának vizsgálatához a specifikus, illetve volumetrikus produktivitást ábrázoltuk a futási idő függvényében. Azt vizsgáltuk, hogy az eltérő rátáplálási stratégiák milyen hatással vannak a produktivitásra.

A kétkomponensű feed segítségével a fehérjeszintézisben kulcs szerepet játszó, esszenciális aminosavak adagolása közben tartható volt a kísérletek során. Valamennyi kísérletben a feedA-t előre meghatározott időpontokban és térfogatban adtuk a tenyészetekhez, így ez a tényező állandó volt, a feedB adagolási módja és mértéke ezzel ellentétben folyamatosan változott. Egyedül a 2.1_a kísérletnél volt egy nappal késleltetve a feedA adagolása, itt a 3. helyett a 4. napon kezdtünk feedelni.

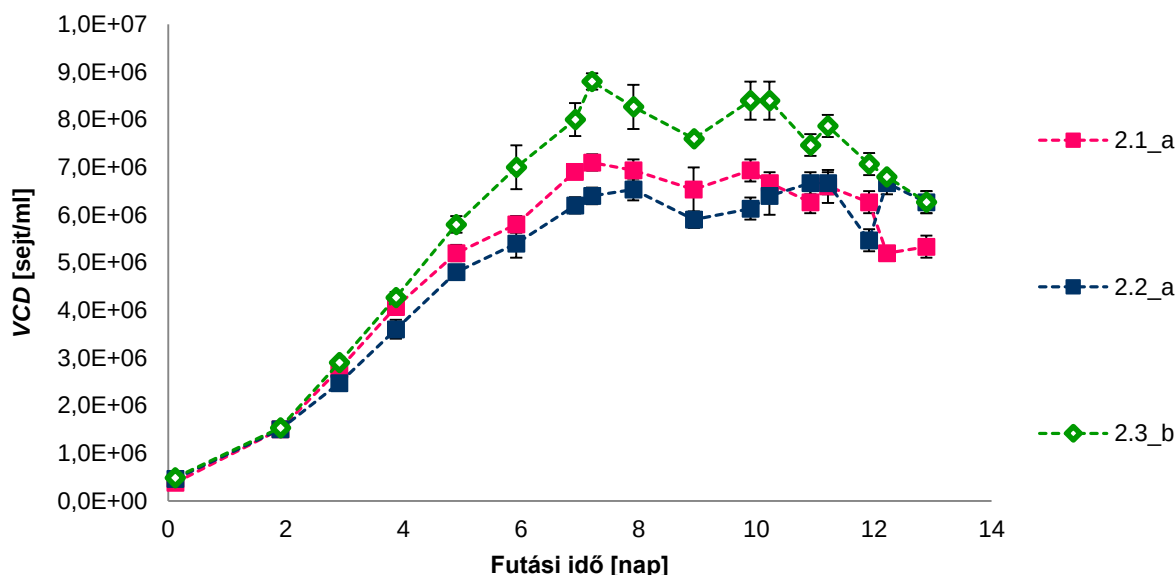
Folytonos feedB rátáplálást 5 kísérletben alkalmaztunk (1.1_a, 1.2_a, 2.1_a, 2.2_a, 2.3_b). A rátáplálási sebességek az egyes kísérleteknél a 13. ábrán láthatóak.



13. ábra: Folytonos feedB rátáplálási sebességek
(az 1.1_a és 1.2_a kísérleteknél a feedB hígítása 1:10; a 2.1_a, 2.2_a és 2.3_b kísérleteknél a hígítás 1:25)

A pumpák fordulatszámának változtatása (tehát az esszenciális aminosavak adagolásának sebessége) az irodalom alapján befolyásolja a sejtek produktivitását, hiszen ezen aminosavak szükségesek a fehérje szintézishez. Emellett a kísérleti eredményeink alapján azt feltételezzük, hogy hatással van a VCD-re is. Az alábbi ábrán a második kísérleti kör VCD

görbái láthatók (14. ábra). Az első (5. ábra) illetve második kísérleti kört összehasonlítva az látható, hogy utóbbinál összességében alacsonyabbak a VCD értékek. A kezdeti sejtszámok és μ értékek nagyon hasonlóak voltak mindegyik kísérletnél a 3. napig.

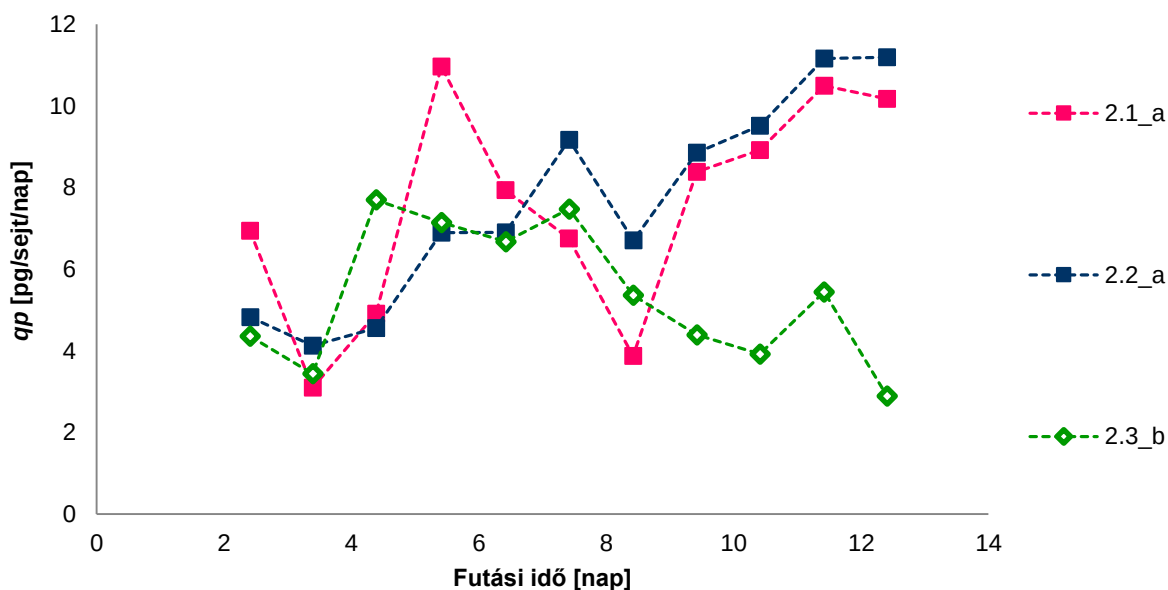


14. ábra: VCD értékek a futási idő függvényében – második kísérleti kör
(a hibajelek a párhuzamos mérések eredményeiből számolt tapasztalati szórás értékeket mutatják)

A kezdeti beállítások - a kezdeti térfogatot leszámítva - azonosak voltak valamennyi kísérlet esetén, azonban a második kísérleti körben a 3. naptól változtattunk néhány paraméteren: a feedA-t 1:2, a feedB-t 1:10 helyett 1:25 arányban hígítottuk. Továbbá fontos megjegyezni, hogy az első kísérleti körnél mind a 4 tenyészet kapott egy bolusz feedB-t a 3. napon, majd az 1.1_a és 1.2_a kísérleteknél folytonosan adagoltuk a feedB-t a 9. naptól kezdve. Az első kísérleti körben alkalmazott 1:10-es hígítással sikerült ugyan stabilizálni a qp -t, azonban olyan limitációt nem tudtunk kiváltani a feedB rátáplálás elindítása előtt, ami teljesen leállította volna a fehérje-termelést - mivel a pumpák fordulatszámát tovább csökkenteni már nem tudtuk. A második kísérleti körnél ezért döntöttünk a feedB további hígítása mellett. A feedA hígítása feltételezhetően nem okozhatott eltérést a sejtszámokban, a 3. napi bolusz feedB elhagyása a második körben azonban már igen. Feltételezhetően a feedB-ben jelen van egy növekedést serkentő komponens, amit azonban az NMR módszerünkkel nem sikerült kimutatni. A második körben ezen komponens hiánya vezethetett a lassabb sejtnövekedéshez. Összefoglalva tehát a 3. naptól tapasztalt VCD csökkenést feltételezhetően a rátáplálási beállításokban eszközölt változtatások okozhatták.

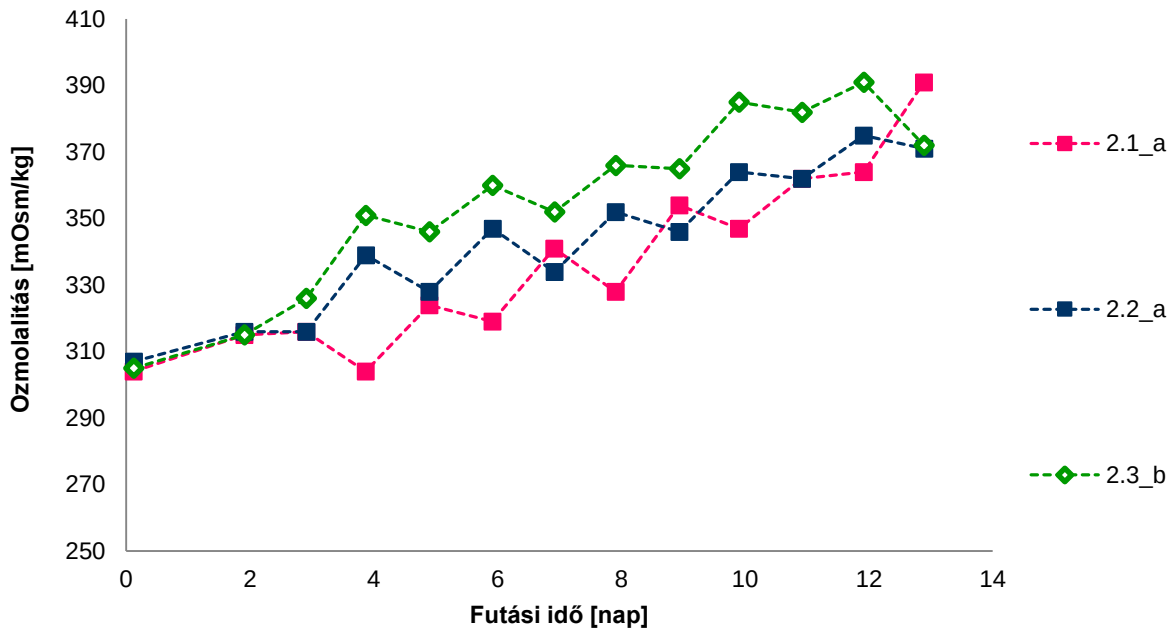
Érdemes megjegyezni, hogy a *b* klón a második kísérleti körben is magasabb sejtszámokat ért el, mint az *a*. Habár a tenyésztési körülmények nem egyeztek meg, ezt a jelenséget mindkét kísérleti körben tapasztaltuk.

A következőkben a specifikus produktivitás befolyásolásával kapcsolatban elért eredményeink bemutatása következik. A specifikus produktivitás értékeit a 11. ábra és a 15. ábra foglalja össze.



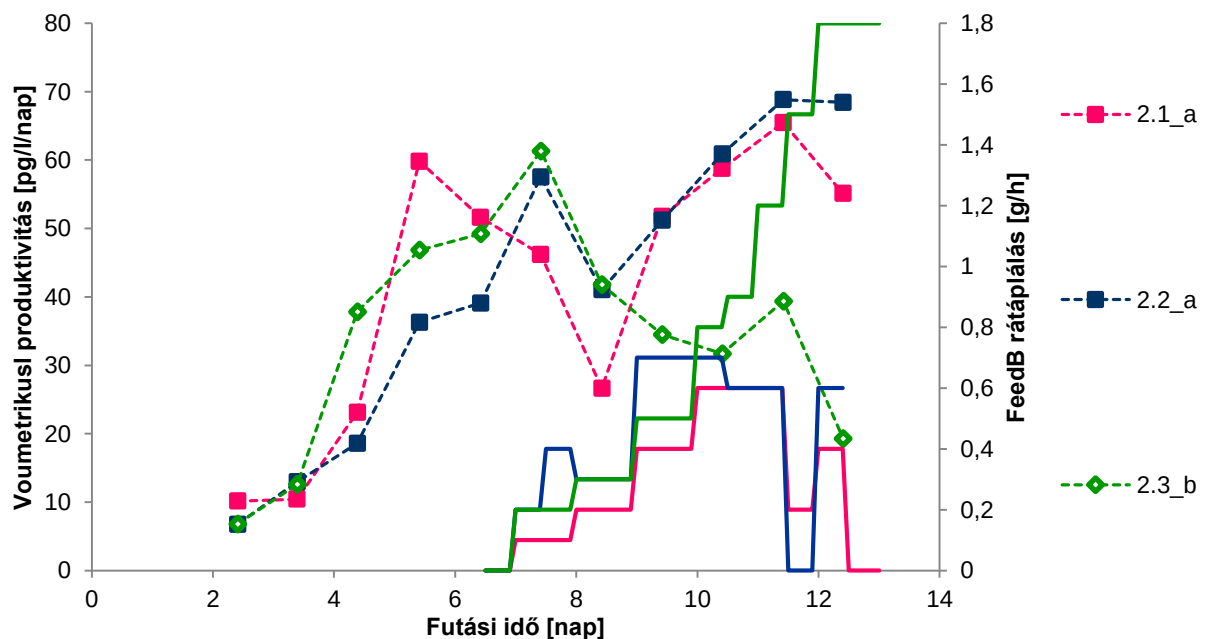
15. ábra: Specifikus produktivitás a futási idő függvényében – második kísérleti kör

A második kísérleti körben minden tenyészetnél folytonos feedB rátáplálást alkalmaztunk. Ezeknél a kísérleteknél nincs ugrásszerű növekedés az ozmolalításban (16. ábra), a *qp* az *a* klónok esetén növekedésnek indult. Ez vélhetően a feedB-t adagoló pumpa-fordulatszám növelésének is köszönhető – az első kísérleti körben azt tapasztaltuk, hogy körülbelül a 8. napon lépett fel tirozin limitáció, ezért indítottuk a 7. napon a feedB pumpákat a második körben. (Fontos megjegyezni, hogy mivel a második kísérleti körben elhagytuk a 3. napi bolusz feedB-t, ezért itt eleve alacsonyabb tirozin koncentráció volt a reaktorokban a feedB rátáplálás indításakor.) Mivel a *qp* görbe növekedésnek indult, feltételezhetően sikerült ezt a tirozin limitációt feloldanunk.



16. ábra: Ozmolalitás a futási idő függvényében – második kísérleti kör

A specifikus produktivás értékek számolása során a sejtszám meghatározás hibáját tovább visszük a qp értékekbe (4.5 fejezet, (3) egyenlet). Mivel a sejtszám meghatározás módszerének nagy a bizonytalansága, a qp értékekben megjelenő zaj eltakarhatja a valódi hatásokat. Ezért ábrázoltuk a volumetrikus produktivás értékeket is az idő függvényében, hogy a tenyészet produktivásában bekövetkező változásokról pontosabb információt nyerjünk.

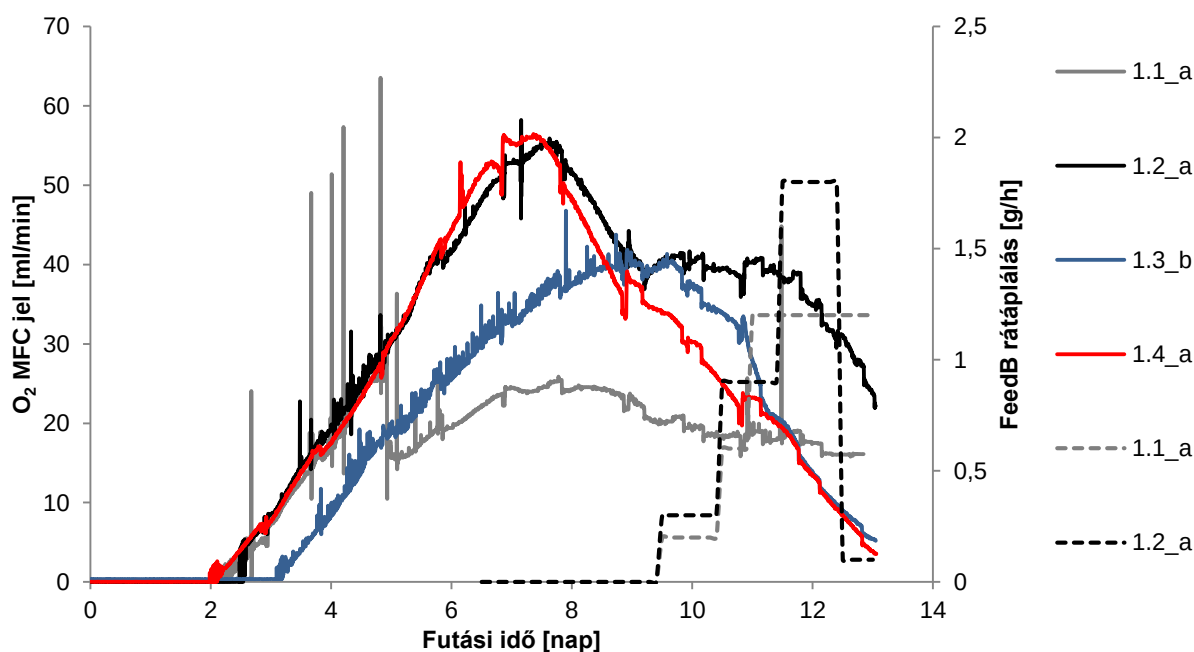


17. ábra: Volumetrikus produktivás és feedB rátáplálási sebesség a futási idő függvényében – második kísérleti kör
(---): vol. prod.; (—): feedB rátáplálás sebessége

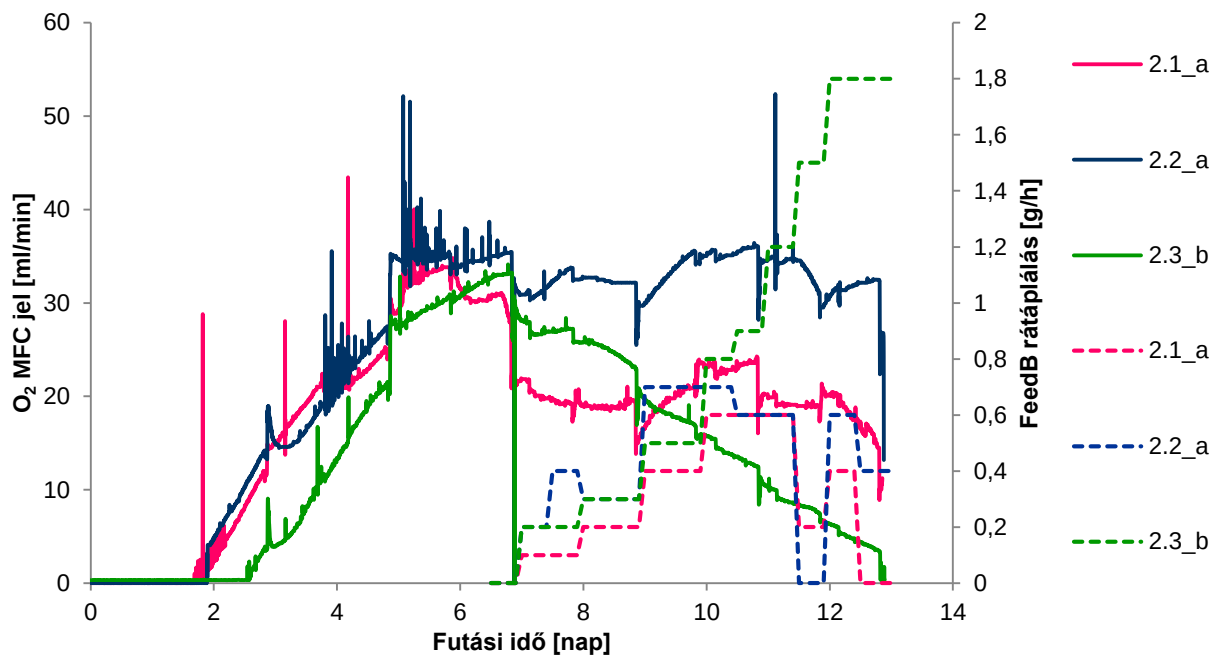
A 17. ábrán jól látszik, hogy az *a* klón esetében (2.1_a és 2.2_a kísérletek) az 5. naptól csökkenni kezd a *qp* értéke, majd a pumpák sebességének növelésével a ~9. napon növekedésnek indul.

Habár a laktát metabolizmus karakterisztikája alapján a *b* klón képes nagyobb titer elérésére, a *qp*-t ennél a klónnál nem tudtuk a befolyásolni, míg az *a* klónok esetén a tirozin-limitáció segítségével sikerült lecsökkenteni a *qp*-t, majd a tirozin-rátáplálás sebességének növelésével kiváltottuk a specifikus produktivitás növekedését.

A feedB-t adagoló pumpa sebességét meghatározott időközönként változtattuk a tenyésztések során. A pumpasebességek megválasztásánál az volt a szempont, hogy minél alacsonyabb sebességről induljon, és a fokozatosan emelkedjen, miközben online nyomon követtük az O₂ MFC jelet. Az O₂ MFC görbék utalnak a sejtek O₂ felvételére, ezért fontos a folyamatos monitorozásuk. Az O₂ MFC görbéket a [18. ábra](#) és a 19. ábra foglalja össze.



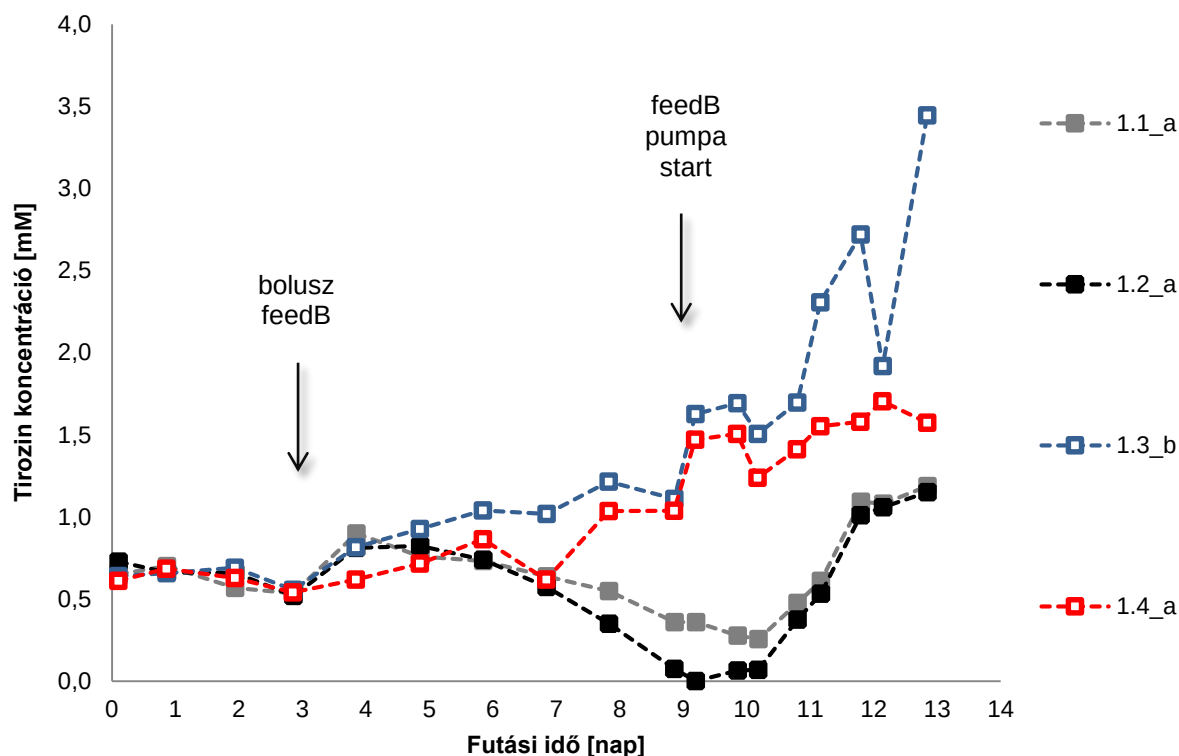
18. ábra: O₂ MFC jel görbéje és a feedB rátáplálás sebessége a futási idő függvényében - első kísérleti kör
(—): O₂ MFC jel, (...): FeedB rátáplálás sebessége



19. ábra: O₂ MFC jel görbéje és a feedB rátáplálás sebessége a futási idő függvényében - második kísérleti kör
(—): O₂ MFC jel, (...): FeedB rátáplálás sebessége

A kísérleti munka során mAb termelő CHO tenyészetek specifikus produktivitásának befolyásolása volt a fő célunk, amit tápanyag-limitációval (elsősorban tirozin-limitációval) próbáltunk elérni. Az O₂ MFC jelek korábbi kísérletek tapasztalatai alapján jó indikátorai a sejtlégzésnek, amit befolyásol az esszenciális aminosavak jelenléte. Ahol az O₂ MFC görbék csökkenni kezdtek, ott a pumpák fordulatszámának dinamikus növelésével az *a* klón esetén sikerült megállítani ezt a csökkenést (2.1_a és 2.2_a kísérletek). A 19. ábrán jól látható, hogy az O₂ MFC görbék a feedB rátáplálás mennyiségét mutató görbékkel hasonlóan futnak – ahol megnöveltük a pumpák fordulatszámát, ott megállt az O₂ MFC görbék csökkenése, ha pedig még tovább növeltük a fordulatszámot, az O₂ MFC görbék növekedésnek indultak. A *b* klón esetén (2.3_b kísérlet) hiába növeltük fokozatosan a feedB rátáplálást, az O₂ MFC jel alapján ennél a klónnál nem tudtuk befolyásolni a sejtek produktivitását.

Az O₂ MFC görbéket a kísérletek alatt a sejtlégzés indikátoraként használtuk fel és on-line követtük nyomon. Ahhoz azonban, hogy megbizonyosodjunk róla, hogy a görbék csökkenésekor a tenyészetekben valóban fellépett aminosav (tirozin) limitáció, NMR vizsgálattal meghatároztuk a tenyészetekből vett minták tirozin koncentrációját. (Az NMR mérések száma korlátozott volt, így nem áll rendelkezésünkre minden mintához tirozin koncentráció érték.)

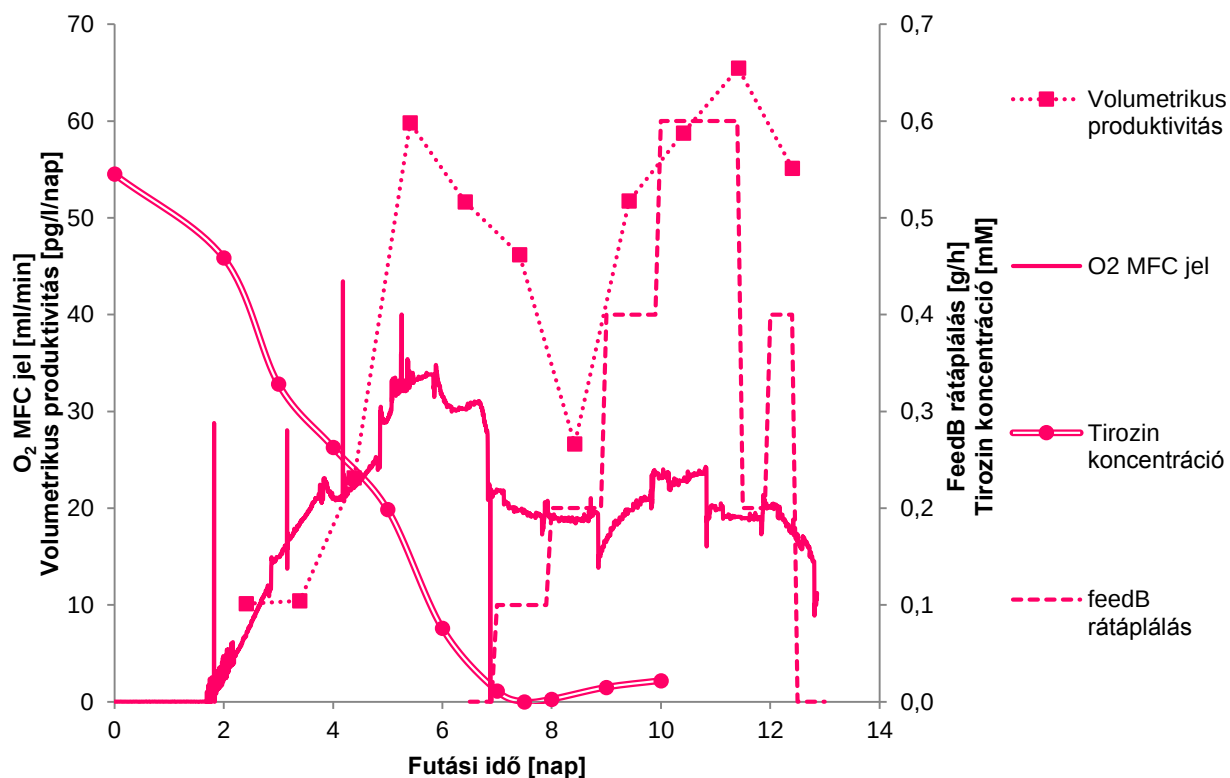


20. ábra: Tirozin koncentrációk - első kísérleti kör

A 20. ábrán látható, hogy az első kísérleti körben a 3. napon adagolt bolusz feedB hatására mind a négy kísérletben megnő a tirozin koncentráció, majd az 1.3_b és 1.4_a kísérletekben a kétnaponta adott bolusz feedB hatására tovább emelkedik. A folytonos rátáplálásos kísérletekben (1.1_a és 1.2_a) a feedB-t adagoló pumpákat a 9. napon indítottuk el, melynek hatása szintén jól látható a görbéken, a pumpák indításától kezdve ezekben a kísérletekben emelkedni kezdett a tirozin koncentráció.

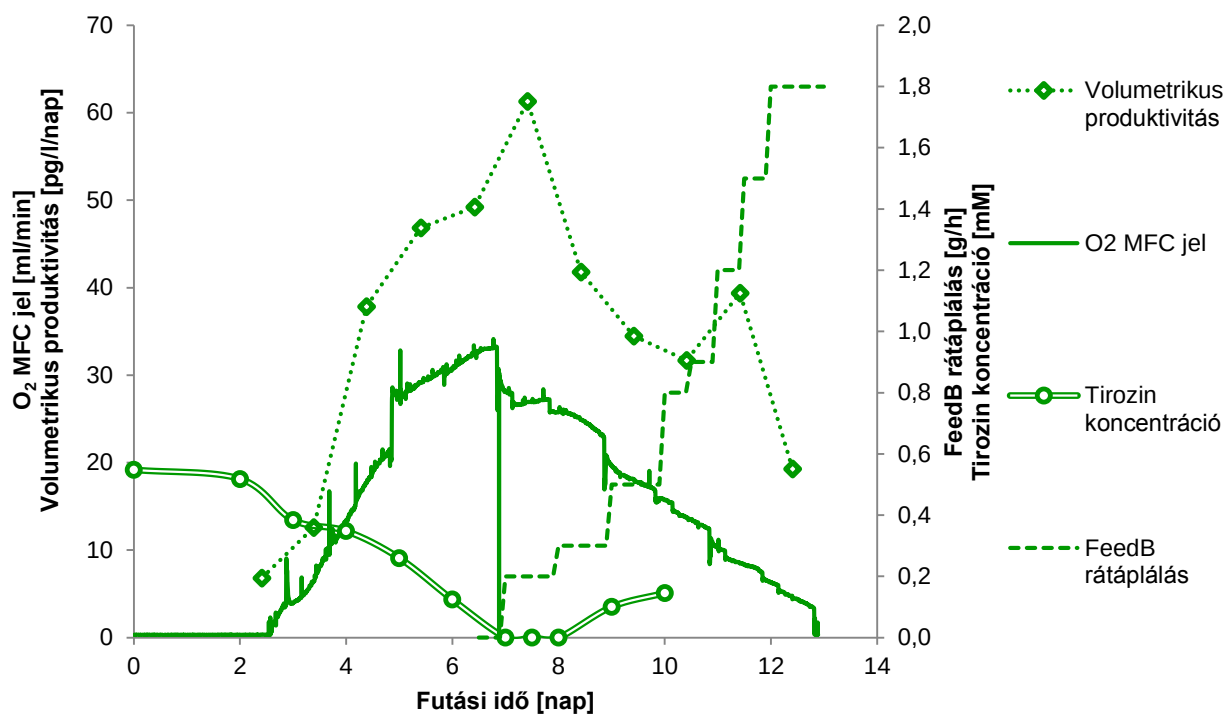
A második kísérleti körben az O₂ MFC görbék jele alapján szabályoztuk a feedB-t adagoló pumpák fordulatszámát, feltételezve, hogy a görbék csökkenésekor a sejtek tápanyag-limitációba kerültek. Ezt a feltételezést megerősítik az NMR vizsgálatok során kapott tirozin-koncentráció adatok (21. ábra). Az ábrán a 2.1_a kísérletre vonatkozó volumetrikus produktivitás-, O₂ MFC jel-, tirozin koncentráció-, és rátáplálási-sebesség görbéket együtt ábrázoltuk.

A görbéken látható, hogy az O₂ MFC jel görbéje és a specifikus produktivitás görbéje hasonló trendet követnek. Látható továbbá a rátáplálás sebessége és a tirozin koncentráció közötti összefüggés, és ezek kapcsolata a fent említett két paraméterrel: a tirozin koncentráció növelésével a q_p emelkedni kezd.



21. ábra: O₂ MFC jel, volumetrikus produktivitás, tirozin-koncentráció és feedB rátáplálási sebesség-görbék - 2.1_a kísérlet

A *b* klón esetében (2.3_b kísérlet) ezen paraméterek közötti összefüggéseket vizsgálva eltérő eredményeket kaptunk: az O₂ MFC jel görbéje a *qp* görbével, továbbá a rátáplálási sebesség görbe a tirozin koncentráció görbével itt is összhangban van, azonban a megnövekedett tirozin koncentráció hatására ebben a kísérletben nem tapasztaltuk a *qp* emelkedését (22. ábra).



22. ábra: O₂ MFC jel, volumetrikus produktivitás, tirozin-koncentráció és feedB rátáplálási sebesség-görbék - 2.3_b kísérlet

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkánk során két kísérleti körben hét kísérletet végeztünk egy mAb-termelő CHO sejtvonal két különböző klónjával (*a* és *b*) fed-batch tenyészetekben. Kísérleteink során 1 liter hasznos térfogatú bioreaktorban tenyésztettük a sejteket, a tenyésztési paramétereket (*pH*, *pO₂*, *T*, keverő-fordulatszám) automata rendszer szabályozta. A rátápláláskor kétkomponensű feedet alkalmaztunk, melynek „A” komponense a szükséges szén-, és nitrogénforrásokat, „B” komponense a sejtek számára esszenciális aminosavakat tartalmazta.

Az első kísérleti körben megtörtént a két klón fiziológiai összehasonlítása, továbbá ugyanezen kísérleti körben az esszenciális aminosavak esetében összehasonlítottuk a kétféle rátáplálási stratégia (bolusz vs. folytonos) hatását a sejtek fiziológiájára és specifikus produktivitására. Kísérleteinkben az esszenciális aminosavak folytonos rátáplálásával magasabb értéken sikerült tartani a tenyészetek produktivitását, mint bolusz adagolásukkal. A bolusz adagolással rátáplált tenyészetekben a specifikus produktivitás csökkenését tapasztaltuk, amit az ozmolalitás ugrásszerű növekedése okozhatott. A metabolizmus vizsgálatok az tapasztaltuk, hogy nemcsak a klónok között vannak különbségek a metabolizmus karakterisztikájában, hanem különböző tenyésztési körülmények között az ugyanazon klónnal (*a*) végzett kísérletek között is.

A második kísérleti körben a specifikus produktivitás befolyásolása volt az elsődleges célunk, ezeknél a kísérleteknél már minden esetben folytonos feedB rátáplálást alkalmaztunk. Az esszenciális aminosavakat tartalmazó oldatot adagoló perisztaltikus pumpa fordulatszámának dinamikus változtatásával sikerült szabályozni az aminosavak koncentrációját a bioreaktorban. A kísérletek során a sejtlégzés indikátoraként on-line követtük nyomon az O₂ MFC jelét. Az eredmények értékelésekor a specifikus produktivitás görbék és az O₂ MFC görbék hasonló trendet követtek. A görbék csökkenését feltételezhetően a tirozin kimerülése okozta, melyet NMR módszerrel sikerült igazolnunk. Az esszenciális aminosavak koncentrációjának változtatásával így sikerült tápanyag-limitációt előidézni, majd feloldani - ezzel elértük a specifikus produktivitás csökkenését, majd növekedését.

Összefoglalva elmondható, hogy tápanyag limitációval sikerült kialakítanunk egy olyan rátáplálási-stratégiát, mellyel kontrollálható a specifikus produktivitás az *a* klón esetén, fed-batch tenyészetben.

7. IRODALOMJEGYZÉK

Birch, J.R., Racher, A.J.: Antibody production. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2006, 58(5-6):671-685

Becerra, S., Berrios, J., Osses, N., Altamirano, C.: Exploring the effect of mild hypothermia on CHO cell productivity. *Biochemical Engineering* 2012, 60:1-8

Borys, M. C., Linzer, D. I. H., Papoutsakis, E. T.: Culture pH affects expression rates and glycosylation of recombinant mouse placental lactogen proteins by Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Biotechnology* 1993, 11:720-724

Dowd J.E., Kwok K.E., Piret J.M.: Glucose-based optimization of CHO-cell perfusion cultures. *Biotechnology and Bioengineering* 2001, 75(2):252-256

Fox, S.R., Tan, H.K., Tan, M.C., Wong, S.C.N.C., Yap, M.G.S., Wang, D.I.C.: A detailed understanding of the enhanced hypothermic productivity of interferon- γ by Chinese-hamster ovary cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 2005, 41(3):255-264

Hansen, H., Emborg, C.: Influence of ammonium on growth, metabolism, and productivity of a continuous suspension Chinese hamster ovary cell culture. *Biotechnology Progress* 1994, 10(1):121-124

Huang, Y-M., Hu, WW., Rustandi, E., Chang, K., Yusuf-Makagiansar, H., Ryll, T.: Maximizing Productivity of CHO Cell-Based Fed-Batch Culture Using Chemically Defined Media Conditions and Typical Manufacturing Equipment. *Biotechnology Progress* 2010, 26(5):1400-1410

Huggett, B., Lahteenmarki, R.: Public biotech 2011 – the numbers. *Nature Biotechnology* 2012, 30:751-757

Jayapal, K.P., Wlaschin, K.F., Hu, W., Yap, M.G.: Recombinant protein therapeutics from CHO cells – 20 years and counting. *Chemical Engineering Progress* 2007, 103:40-47

Kim, D.Y., Chaudry, M.A., Kennard, M.L., Jardon, M.A., Braasch, K., Dionne, B., Butler, M., Piret, JM.: Fed-batch CHO cell t-PA production and feed glutamine replacement to reduce ammonia production. *Biotechnology Progress* 2013, 29(1):165-175

Kim, J.Y., Kim, Y.G., Lee G.M.: CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2012, 93(3):917–930

Kim, S. H., Lee, G. M.: Differences in optimal pH and temperature for cell growth and antibody production between two chinese hamster ovary clones derived from the same parental clone. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 2007, 17(5):712-720

Kyriakopoulos, S., Kontoravdi, C.: Analysis of the landscape of biologically-derived pharmaceuticals in Europe: Dominant production systems, molecule types on the rise and approval trends. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012, 48(3):428-441

Link, T., Bäckström, M., Graham, R., Essers, R., Zörner, K., Gätgens, J., Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J., Hansson, G.C., Noll, T.: Bioprocess development for the production of a recombinant MUC1 fusion protein expressed by CHO-K1 cells in protein-free medium. *Journal of Biotechnology* 2004, 110:51–62

Lu, F., Toh, P.C., Burnett, I., Li, F., Hudson, T., Amanullah, A., Li, J.: Automated Dynamic Fed-Batch Process and Media Optimization for High Productivity Cell Culture Process Development. *Biotechnology and Bioengineering* 2013, 110(1):191-205

Maranga, L., Goochee, C.F.: Metabolism of PER.C6TM cells cultivated under fed-batch conditions at low glucose and glutamine levels. *Biotechnology and Bioengineering* 2006, 94(1):139–150

Osman, J. J., Birch, J., Varley, J.: The response of GS-NS0 myeloma cells to pH shifts and pH perturbations. *Biotechnology and Bioengineering* 2001, 75:63-73

Schaub, J., Clemens, C., Kaufmann, H., Schulz, T.W.: Advancing Biopharmaceutical Process Development by System-Level Data Analysis and Integration of Omics Data. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 2012, 127:133-163

Sheikholeslami, Z., Jolicoeur, M., Henry, O.: Elucidating the Effects of Postinduction Glutamine Feeding on the Growth and Productivity of CHO Cells. *Biotechnology Progress* 2014, 30(3):535-546
Shukla, A.A., Thömmes, J.: Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends in Biotechnology* 2010, 28(5):253-261

- Sunley, K, Butler, M.: Strategies for the enhancement of recombinant protein production from mammalian cells by growth rates. *Biotechnology Advances* 2010, 28(3):385-394
- Takagi, M., Hia, H. C., Jang, J. H., Yoshida, T.: Effects of high concentrations of energy sources and metabolites on suspension culture of Chinese hamster ovary cells producing tissue plasminogen activator. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2001, 91:515-521
- Takuma S., Hirashima C., Piret J.M.: Dependence on glucose limitation of the pCO₂ influences on CHO cell growth, metabolism and IgG production. *Biotechnology and Bioengineering* 2007, 97(6):1479-1488
- Templeton, N., Dean, J., Reddy, P., Young, J.D.: Peak Antibody Production is Associated With Increased Oxidative Metabolism in an Industrially Relevant Fed-Batch CHO Cell Culture. *Biotechnology and Bioengineering* 2013, 110(7):2013-2024
- Vijayasankaran, N., Li, J., Shawley, R., Chen, A., Shiratori, M., Gawlitzek, M., Li, F., Kiss, R., Amanullah, A.: Animal cell culture media. In: Flickinger MC, editor. *Encyclopedia of industrial biotechnology: Bioprocess, bioseparation, and cell technology* 2009. New York: John Wiley & Sons, 1–15
- Wiebe, M. E.: A multifaceted approach to assure that recombinant tPA is free of adventitious virus. *Advances in Animal Cell Biology and Technology* 1989, 68-71
- Wong, D.C.F., Wong, K.T.K., Goh, L.T., Heng, C.K., Yap, M.G.S.: Impact of Dynamic Online Fed-Batch Strategies on Metabolism, Productivity and N-Glycosylation Quality in CHO Cell Cultures, *Biotechnology and Bioengineering* 2005, 89(2):164-177
- Wurm, F.M.: Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology* 2004, 22(11):1393-1398
- Yang, H., Ierapetritou, M.G., Roth, C.M.: Effects of amino acid transport limitations on cultured hepatocytes. *Biophysical Chemistry* 2010, 152(1-3):89–98
- Yee, J.C., Gerdtzen, Z.P., Hu, W-S.: Comparative Transcriptome Analysis to Unveil Genes Affecting Recombinant Protein Productivity in Mammalian Cells. *Biotechnology and Bioengineering* 2009, 102(1):246-263

Yoon, S. K., Hwang, S. O., Lee, G. M.: Enhancing effect of low culture temperature on specific antibody productivity of recombinant Chinese hamster ovary cells: clonal variation. *Biotechnology Progress* 2004, 20(6):1683-1688

Young, J.D.: Metabolic flux rewiring in mammalian cell cultures. *Current Opinion in Biotechnology* 2013, 24:1108-1115

Yu, M., Hu, Z., Pacis, E., Vijayasankaran, N., Shen, A., Li, F.: Understanding the Intracellular Effect of Enhanced Nutrient Feeding Toward High Titer Antibody Production Process. *Biotechnology and Bioengineering* 2011, 108:1078-1088

Zhu, M.M., Goyal, A., Rank, D.L., Gupta, S.K., Boom, T.V., Lee, S.S.: Effects of elevated pCO₂ and osmolality on growth of CHO cells and production of antibody-fusion protein B1: A case study. *Biotechnology Progress* 2005, 21:70–77

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani a Richter Gedeon Nyrt.-nek, amiért lehetőséget kaptam bekapcsolódni ebbe az izgalmas, és kihívásokkal teli kutatómunkába. Köszönöm Zalai Dénes kutató-fejlesztőnek a támogatását, és szakmai felkészítését. Köszönettel tartozom a Biotechnológiai Osztály mérnökeinek és technikusainak, amiért mindig segítségemre voltak a felmerülő kérdések és problémák megoldásában. Köszönöm továbbá Dr. Gergely Szilveszter egyetemi docensnek a támogatását.